

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PEPTİTLERİN KÜTLE SPEKTROMETRESİNDEKİ PARÇALANMASINA
METALLERİN ETKİSİ**

Filiz DOĞAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PEPTİTLERİN KÜTLE SPEKTROMETRESİNDEKİ PARÇALANMASINA METALLERİN ETKİSİ

Filiz DOĞAN

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Kütle spektrometresinin boy ölçüşülemez hassaslık, tayin sınırı, hızlı analize imkan tanıma ve uygulamadaki çeşitliliği gibi karakteristikleri, onu analitik metodlar arasında önemli bir yere taşımıştır. Özellikle biyolojik materyallerin yapılarının aydınlatılmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri olmuştur. Proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, peptit-metal etkileşimlerinin elektrosprey ile kütle spektrometresinin birleşimden doğan ESI-MS tekniği kullanılarak çalışılmaktadır. Sekans belirlemeye hızlı ve doğru bir şekilde imkan tanıyan bu yöntem, proteomiğin gelişmesine yardımcı olmuştur.

Ocak 2013, 91 sayfa

Anahtar Kelimeler: MS, Peptitlerin Birincil Yapıları, Metal Çözeltisi, İyon Kümeleri

ABSTRACT

Master Thesis

METAL EFFECTS TO PEPTIDES ON THEIR FRAGMENTATION BY MASS SPECTROMETRY

Filiz DOĞAN

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI

Mass spectrometry has become an extreme analytical area as it has sensitivity, low detection limits and rapid responses to the analyses. Especially it is common in enlightening structures and functional specialities of biological materials. Working with proteins to analyse their functions, solutions with metals are used as ESI-MS samples (Electrospray Ionization Mass Spectrometry). Determining sequence of peptides with this method helps proteomic to improve itself.

January 2013, 91 pages

Key Words : MS/MS, Primary Structure of Peptides, Metal Solutions, Ion Clusters

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında maddi manevi desteğiyle yanımda olan bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI' ya (Ankara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı) çalıőmalarım süresince manevi desteğiyle yanımda olan aileme ve kuzenim Uzm. Dr. Baőak AKTÜRK' e (Gazi Üniversitesi Hastanesi, Psikiyatri Anabilim Dalı) en içten duygularımla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araőtırmalar Projeler tarafından 09B4240015 nolu proje olarak desteklenmiőtir.

Filiz DOğAN

Ankara, Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Kütle Spektrometresi ve Bileşenleri.....	3
1.2 Numune Giriş Sistemi ve İyonlaştırıcı Sistem.....	4
1.3 Kütle Analizörü.....	6
1.4 Uçuş Zamanlı Analizör TOF (Time of Flight).....	7
1.5 Kuadropol.....	8
1.6 İyon Tuzağı.....	9
1.7 Dedektör.....	10
1.8 Veri.....	10
2. KURAMSAL TEMELLER.....	22
2.1 Protein Çalışmaları.....	22
2.2 Proteom Analizinin Önemi.....	22
2.3 Proteinlerin Birincil/Primer Yapıları	24
2.4 Metaller ile İlgili Çalışmalar.....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1 Kullanılan Materyaller	42
3.2 Kullanılan Kimyasallar	42
3.3 Hazırlanan Katyon Çözeltileri	56
3.4 Peptit Çözeltilerinin ve Katyon Bileşimlerinin Hazırlanması.....	56
3.5 Q-Tof' un Çalıştırılması ve Kullanılması.....	58
3.6 Rezolüsyonun Ayarlanması.....	59
3.7 MS Matematiksel Çözümleme.....	60
3.8 ToF Kalibrasyonu	64
3.9 Cihazın Kalibre Edilmesi.....	65

4. BULGULAR.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
5.1 Na, K, Li Katyonlarının Etkileri.....	78
5.2 Ca, Co, Mg, Fe, Cu Katyonlarının Etkileri.....	80
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	91

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Ala-Alanin
C	Cys-Sistein
CID	CollisionInducedDissosiation, Çarpışma İndüklü Parçalanma
D	Asp-Aspartat
E	Glu-Glutamin
EPA	EnvironmentalProtectionAgency
ESI	Electro-SprayIonization; Elektro-Sprey İyonizasyonu
F	Phe-Fenilalanin
FWHM	Full WidthHeight M
G	Gly-Glisin
H	His-Histidin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography; Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
I	Ile-İzolözin
IR	Infrared Spektroskopisi
ICR	Ion Cyclotron Resonance; İyon Hızlandırıcı Rezonans
K	Lys-Lizin
L	Leu-Löszin
LC	Liquid Chromatography; Sıvı Kromatografisi
M	Met-Metiyonin

MALDI	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon-İyonizasyon Kütle Spektrometrisi
MS	Mass Spectrometry; Kütle Spektrometresi
N	Asn-Asparajin
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
NIH	National Institutes of Health
NIST	National Institute of Standards and Technology
P	Pro-Prolin
Q	Gln-Glutamin
R	Arg-Arginin
S	Ser-Serin
T	Thr-Treonin
Th	Thomson, u/e
TOF	Time Of Flight; Uçuş Zamanlı Analizör)
u	Atomicmassunit; amu; $1.66053886 \times 10^{-27} \text{kg}$
V	Val-Valin
Y	Tyr-Tirozin
W	Trp-Triptofan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 MS cihazının bileşenleri.....	4
Şekil 1.2 Örneğin aldığı yol.....	4
Şekil 1.3 Nano LC Kapiler.....	4
Şekil 1.4 Elektrosprey ile numunenin iyonlaştırılması.....	5
Şekil 1.5 ESI ile oluşan yüklü damlacıkların taşınması.....	6
Şekil 1.6 Yüklü damlacıkların bölünmesi.....	6
Şekil 1.7 İyonların m/z değerlerine göre birbirlerinden ayrılması	7
Şekil 1.8 Kuadropolün yapısı.....	8
Şekil 1.9 Kuadropolde uçan iyonlar.....	8
Şekil 1.10 İyon tuzağına yakalanan iyonlar.....	9
Şekil 1.11 Pik çözünürlüğü ve tepeler arasındaki ilişki.....	11
Şekil 1.12 Kütle çözünürlüğü ve kütle doğruluğu arasındaki ilişki.....	12
Şekil 1.13 Üst üste pikler-deneysel pikler.....	14
Şekil 1.14 Kütle spektrometresinde faydalı izotop kümeleri.....	15
Şekil 1.15 Örnek peptit: AGSIPK.....	15
Şekil 1.16 Peptit parçalanmasında ortaya çıkan major iyonlar.....	16
Şekil 1.17 Peptitin yapısına göre yük ve parçalanma.....	17
Şekil 1.18 İlk adım-peptitlerin protonlanması.....	17
Şekil 1.19 Lys veya Arg ile tek yüklü iyonlar; protonun hapsedilmesi.....	18
Şekil 1.20 Çift yüklü iyonlar; 2. protonun hareketi yönlendirmesi	18
Şekil 1.21 Normal şartlarda oluşan fragman iyonlar	19
Şekil 1.22 Yük yönlendirildiği zaman oluşan iyonlar.....	19
Şekil 1.23 Prolin etkisi: parçalanma N-terminal uçta gerçekleşir.....	20
Şekil 1.24 NMeAla etkisi: parçalanma C-terminal uçta gerçekleşir.....	20
Şekil 1.25 Pipecolinic asit: NmeAla' dan daha çok Pro' ya benzerlik gösterir.....	20
Şekil 1.26 Histidin etkisi.....	20
Şekil 1.27 Aspartik asit ve Glutamik asit etkileri: yük etkisiyle parçalanma.....	21
Şekil 1.28 Deprotone olmuş peptitlerin parçalanması [M-H] ⁻	21
Şekil 2.1 Proteom analizinin tarihsel gelişimi.....	22

Şekil 2.2 Peptit yapısının aydınlatılmasında bir dizi analiz.....	23
Şekil 2.3 Bir peptidin bir dizi analizle sekansının belirlenmesi.....	23
Şekil 3.1 Kütle spektrometresi programı ana sayfası.....	61
Şekil 3.2 Kromotogram sayfası.....	61
Şekil 3.3 Kromotogram sayfasında örnek bir tarama.....	61
Şekil 3.4 Örnek taramanın matematiksel seçeneklerinin girilmesi.....	62
Şekil 3.5 Örnek taramanın elde edilen spektrumu.....	62
Şekil 3.6 Matematiksel hesaplamamanın birinci adımı, ‘Subtract’.....	62
Şekil 3.7 Matematiksel hesaplamamanın ikinci adımı, ‘Smooth’.....	63
Şekil 3.8 Matematiksel hesaplamamanın üçüncü adımı, ‘Center’.....	63
Şekil 3.9 QToF ayar penceresi.....	63
Şekil 3.10 Matematiksel çözümleme sonucu elde edilen spektrum	64
Şekil 4.1 NPY:Ca çözültisi için optimum koşullar.....	71
Şekil 4.2 NPY:Co çözültisi için optimum koşullar.....	71
Şekil 4.3 NPY:Cu çözültisi için optimum koşullar.....	71
Şekil 4.4 NPY:Fe çözültisi için optimum koşullar.....	71
Şekil 4.5 NPY:K çözültisi için optimum koşullar.....	72
Şekil 4.6 NPY:Li çözültisi için optimum koşullar.....	72
Şekil 4.7 NPY:Mg çözültisi için optimum koşulla.....	72
Şekil 4.8 NPY:Na çözültisi için optimum koşullar.....	72
Şekil 4.9 Vpr:Ca çözültisi için optimum koşullar.....	73
Şekil 4.10 Vpr:Co çözültisi için optimum koşullar.....	73
Şekil 4.11 Vpr:Cu çözültisi için optimum koşullar.....	73
Şekil 4.12 Vpr:Fe çözültisi için optimum koşullar.....	73
Şekil 4.13 Vpr:K çözültisi için optimum koşullar.....	74
Şekil 4.14 Vpr:Li çözültisi için optimum koşullar.....	74
Şekil 4.15 Vpr:Mg çözültisi için optimum koşullar.....	74
Şekil 4.16 Vpr:Na çözültisi için optimum koşullar.....	74
Şekil 4.17 Betanova:Ca çözültisi için optimum koşullar.....	75
Şekil 4.18 Betanova:Co çözültisi için optimum koşullar.....	75
Şekil 4.19 Betanova:Cu çözültisi için optimum koşullar.....	75
Şekil 4.20 Betanova:Fe çözültisi için optimum koşullar.....	75

Şekil 4.21 Betanova:K çözeltisi için optimum koşullar.....	76
Şekil 4.22 Betanova:Li çözeltisi için optimum koşullar.....	76
Şekil 4.23 Betanova:Mg çözeltisi için optimum koşullar	76
Şekil 4.24 Betanova:Na çözeltisi için optimum koşullar	76
Şekil 5.1 İyon kümesi oluşumuna yoğunluğun etkisi.....	79
Şekil 5.2 NPY peptiti iyon türlerinin bağıl yoğunluklarının karşılaştırılması.....	82
Şekil 5.3 NPY peptit zincirinin Ca^{2+} metaliyle etkileşimi.....	82
Şekil 5.4 Vpr peptit zincirinin katyonlarla etkileşimi.....	83
Şekil 5.5 Betanova peptiti iyon türlerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 5.6 Betanova peptitinin Mg^{2+} katyonuyla etkileşimi.....	84
Şekil 5.7 Parçalanma enerjisinin iyon sayısına etkisi.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Elementlerin izotopik bollukları	15
Çizelge 1.2 Parçalanma ve parçalanma enerjisi arasındaki ilişki.....	18
Çizelge 2.1 Çözeltide oluşan bakır iyonu kümeleri.....	31
Çizelge 2.2 NaCO ₃ çözeltisi iyon kümeleri.....	32
Çizelge 3.1 Projede kullanılan kimyasallar.....	42
Çizelge 3.2 Kullanılan peptitlerin kimyasal özellikleri.....	43
Çizelge 3.3 Glu-Fib peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapıları ve kütleleri.....	44
Çizelge 3.4 NPY peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve kütleleri.....	44
Çizelge 3.5 NPY peptiti için Biemann iyonları listesi	45
Çizelge 3.6 NPY peptitinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve kütleleri.....	46
Çizelge 3.7 Vpr peptiti için Biemann iyonları listesi	48
Çizelge 3.8 Vpr peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve kütleleri.....	49
Çizelge 3.9 Vpr peptitinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve kütleleri	49
Çizelge 3.10 Betanova peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve kütleleri.....	50
Çizelge 3.11 Betanova peptiti için Biemann iyonları listesi	51
Çizelge 3.12 Betanova peptitinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve kütleleri.....	52
Çizelge 3.13 Potasyum atomunun izotopları.....	53
Çizelge 3.14 Lityum atomunun izotopları.....	54
Çizelge 3.15 Bakır atomunun izotopları.....	54
Çizelge 2.16 Kalsiyum atomunun izotopları	54
Çizelge 3.17 Demir atomunun izotopları.....	55
Çizelge 3.18 Magnezyum atomunun izotopları.....	55
Çizelge 3.19 Çalışılan katyonların stok çözeltileri.....	56
Çizelge 3.20 Çalışma çözeltilerinin metal:peptit oranları.....	57
Çizelge 3.21 Kalibrasyon çözeltisinde kullanılan peptitlerin iyonik yapıları.....	64
Çizelge 4.1 Çalışılan çözeltilerde optimum çalışma derişimleri.....	66
Çizelge 4.2 NPY peptiti için gözlenen iyonik ürünler.....	68
Çizelge 4.3 Vprpeptiti için gözlenen iyonik ürünler.....	69
Çizelge 4.4 Betanovapeptiti için gözlenen iyonik ürünler.....	70
Çizelge 5.1 Kullanılan peptitler ve oluşturdukları iyon çeşitleri.....	81

Çizelge 5.2 Vprpeptiti için 100:1 metal:peptit oranında çeşitli parçalanma enerjilerinde ortamda bulunan toplam iyon sayıları.....	86
---	----

1. GİRİŞ

Kütle spektrometresi, molekülleri kütle/yük oranlarına göre ayıran analitik cihazlardır. Kütle spektrometresinin boy ölçüşülemez hassaslığı, tayin sınırının düşüklüğü, oldukça hızlı analize imkan tanınması ve uygulama alanındaki çeşitlilikten dolayı analitik metodlar arasında önemli bir yeri vardır. Özellikle biyolojik materyallerin yapılarının aydınlatılmasında çok kullanılan yöntemlerden biridir. Proteom, metabolom, ilaç çalışmaları gibi son gelişmelerin çoğu kütle spektrometresi ile çalışılarak önemli ilerlemeler kaydetmiştir.

Proteinlerin yapılarının aydınlatılması için, kendi aralarındaki etkileşimler farklı tekniklerle açıklanmaya çalışılmıştır. Makromoleküllerin kompleks yapıda ve büyük boyutlarda olmaları bu çalışmaları zorlaştırmaktadır. Bu nedenle proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının aydınlatılmasında, proteinlere göre daha az kompleks olan peptitlerin yapı analizleri önem kazanmıştır. Özellikle peptit-metal etkileşimlerinin proteinlerin yapısını açıklayabilmek için iyi birer veri kaynağı olabileceği görülmüştür. Elektrosprey ile kütle spektrometresinin birleşiminden doğan ESI-MS tekniği kullanılarak sekans belirlemeye hızlı ve doğru bir şekilde imkan tanıyan bu yöntem, proteomiğin gelişmesine yardımcı olmuştur. Kütle spektrometresi yöntemi bu açıdan önde gelen çalışma alanlarından biridir.

Kütle spektrometresinin kimyasal analizlerde ilk kullanımları, 1940'lı yıllarda, petrokimya endüstrisindeki hidrokarbon karışımlarının kantitatif analizleriyle başlamıştır. Önceleri az sayıda hidrokarbon içeren karışımların analizi, fraksiyonlu damıtma sonrası ayrılan bileşenlerin kırma indislerinin ölçülmesiyle yapılıyordu. Böyle bir analizin tamamlanması en az 200 saat gerektiriyordu. Benzer bir analiz kütle spektrometresiyle ise birkaç saatte gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum, ticari kütle spektrometrelerinin hızla gelişip yaygınlaşmasına neden olmuştur.

1950'li yılların başında kütle spektrometreleri, kimyacılar tarafından organik maddelerin teşhisinde ve yapı tayininde kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra nükleer manyetik rezonans ve geliştirilmiş infrared spektrometreleri ile birleştirilmesi sonucu,

organik kimyacılar için hem madde tanımda hem de moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında kütle spektrometrisi yaygın yöntemlerden biri olmuştur. Kütle spektrometrelerinin bu şekilde uygulaması günümüzde de çok yaygındır.

Kütle spektrometresinin amino asitler ve peptitler üzerinde ilk kullanımları ise 1950'li yılların sonlarında gerçekleşmiştir. Örneğin; Carl-Ove Andersson metil esterlerinin ana iyon parçalarının aydınlatılması üzerine çalışmıştır.

1980'li yıllara gelindiğinde, kütle spektrometrelerinin moleküler uygulamaları, biyokimyacı ve biyologların sık sık karşılaştıkları uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddeleri iyonlaştırmak için geliştirilen yöntemler sayesinde önemli ölçüde değişime uğramıştır. 1990'dan beri bu yeni iyonlaştırma yöntemlerinin kullanımı çok fazla artış göstermiştir.

Kütle spektrometrisi en hızlı gelişimini son 20 yılda kaydetmiştir. Bu gelişmeler teknolojik olarak yeni özelliklerin cihazlara kazandırılmasıyla sağlanmıştır. Bunların başında, atmosferik basınç kaynaklarının gelişimi, analizörlerin hassasiyetinin artması ve cihazların birbirleriyle kombine edilmesi gelmektedir.

Günümüzde kütle spektrometreleri polipeptitlerin, proteinlerin ve diğer yüksek molekül kütleli biyopolimerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılmaktadır. 2002 yılında John Fenn, *Elektro-sprey iyonlaştırma metodu ile kütle spektrometresinde biyomoleküllerin analizi* çalışmasıyla Nobel ödülü almıştır (Hoffmann 2007).

Kütle Spektrometresi kullanım alanları genel olarak şu şekilde sıralanabilir;

- Maddelerin elementel bileşimlerinin belirlenmesi,
- İnorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılması,
- Karışımların kalitatif ve kantitatif analizleri,
- Katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin açığa kavuşturulması,
- Bir numunedeki atomların izotopik oranlarının bulunması.

1.1 KütLe Spektrometresi ve Bileşenleri

Elektromagnetik ışımının belli bir alanında, örneğin farklı dalga boylarında verdiği etkileşimlerle ilgilenen alana *Spektroskopi* denir.

KütLe spektrometresi, manyetik veya elektriksel alanda hareket eden iyonik yapıları kütle/yük oranlarına göre ayıran spektroskopik bir cihazdır. Modern kütle spektroskopisi, yüksek kütle dağılımı ve doğru analize imkan tanır.

KütLe spektrometresi cihazının ana parçaları;

1. İyonlaştırıcı

- MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon-İyonizasyonu)
- ESI (Electro-Spray Ionization; Elektro-Sprey İyonizasyonu, İyon Sprey, Nano Sprey, Sonik Sprey)

2. KütLe analizörü

- TOF (Time Of Flight; Uçuş Zamanlı Analizör)
- Quadrapole (Kuadrapol; Dörtlü Kutup)
- Ion Trap (İyon Tuzağı)

3. Detektör

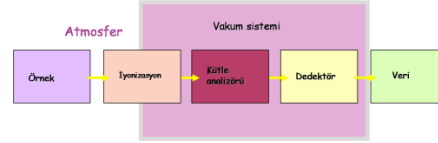
4. Veri (spektrum)

Elektromanyetik ışımının bir fonksiyonu olarak ölçülen sinyallerin yani absorbanların toplamına *spektrum* denir. Dalgaboyunun (frekansın ya da enerjinin) bir fonksiyonu olan cevap alanı yani sinyaller toplamı bir spektrum oluşturur. KütLe spektrumuna, iyon kaynağı tarafından üretilen farklı m/z oranlarındaki iyon bolluğuna bağlı olarak oluşturulan "*kimyasal parmakizi*" de denir.

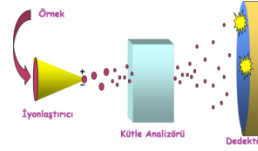
MS cihazının çalışma prensibi;

- 1) Örneklerden iyonların elde edilmesi,
- 2) Farklı kütlelerdeki iyonların birbirinden ayrılması,
- 3) Kütle spektrumu şeklinde verilerin biriktirilmesi.

Şekil 1.1’de kütle spektrometresiyle çalışırken, sıvı haldeki numunenin izlediği yol görülmektedir. İyonlaştırıcıdan şekil 1.2’de iyon buharı şeklinde çıkan örnek, kütle analizöründe kütesine göre filtre edildikten sonra dedektöre iletilir ve spektrum oluşturulur.

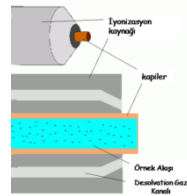


Şekil 1.1 MS cihazının bileşenleri



Şekil 1.2 Örneğin aldığı yol

1.2 Numune Giriş Sistemi ve İyonlaştırıcı Sistem

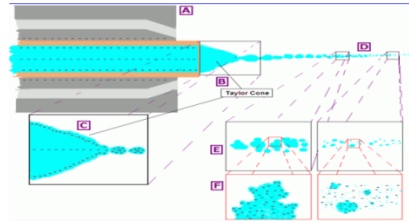


Şekil 1.3 NanoLC Kapiler

Bileşik analizlerinin kütle spektrometresindeki ilk adımı, gaz fazındaki iyonların oluşturulması biçimindedir. Şekil 1.3’de görülen numune giriş sistemi, çok az

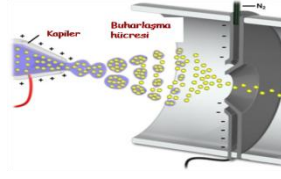
miktardaki numuneyi (mikromol) kütle spektrometresinin içine verir. Numune giriş sistemi katı ve sıvıları buharlaştırmak için bir ünite içerir. İyonizasyon işlemi ile moleküller uyarılarak iyonize hale dönüştürülür. Girişte oluşan moleküler iyon, genellikle fragmanlarına ayrılır; çünkü radikalik yapıdadır ve tek sayıda elektrona sahiptir. Bu nedenle bir radikal ve bir de iyon ya da bir radikal ve bir de molekül vermek üzere tekrar fragmanlarına ayrılabilir. Çoğu zaman numune giriş sistemi ile iyon kaynağı oluşturma sistemi birleştirilmiştir. Her iki durumda da pozitif veya negatif iyonlar (çoğunlukla pozitif iyonlar) kütle analizörüne doğru hızlandırılırlar.

ESI, protein ve peptit karışımlarını iyonlaştırmak için sıkça kullanılan bir iyonlaştırma sistemidir. Kütle spektrometresi ile atmosferik basınç arasında doğrudan bir ara yüzey sağlar. Bu yöntem HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), sıvı kromatografisi (LC), kapiler elektroforez gibi ayırma teknikleri ile kolaylıkla birleştirilebilir. Fakat ESI daha zengin bir MS/MS spektrumu için çok daha çeşitli iyonlar sağlar. Peptit çözeltisi kapiler uçlar ya da özel şırıngalar kullanılarak, nanoelektro-spreyde püskürtülüp iyon kaynağına giriş yapar. Kapilere 2000-5000V gerilim uygulanır. Bu gerilimle çözeltideki moleküller yüklü hale geçip şekil 1.4'deki gibi bir püskürtülürler (Hoffman 2007).



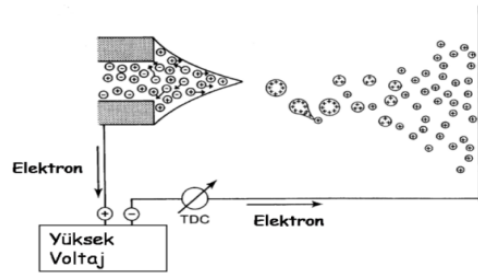
Şekil 1.4 Elektrosprey ile numunenin iyonlaştırılması

İyonizasyon işlemi, kütle spektrometresinin girişi ile küçük bir tüpün ucu arasında elektriksel alan uygulanarak gerçekleştirilir. Elektriksel alan, yüklü sıvıyı numune çıkışının sonunda bir koni oluşturması için zorlar. Şekil 1.4-1.5'de görülen Taylor konisi adı verilen bu oluşum, yük/yüzey oranını azaltır. Koninin ucunda damlacıklar oluşur ve kütle spektrometresinin girişine doğru taşınır.



Şekil 1.5 ESI ile oluşan yüklü damlacıkların taşınması

Serbest hale geçen damlacıklar, 200⁰C'de azot gazının geçtiği buharlaşma hücresine girerler. Burada damlacıklar üzerlerindeki yük yoğunluğunu azaltmak için daha küçük damlacıklara bölünebilirler. Bu işlem, çözücü kaybolurken boyutları giderek küçülen çok sayıda damlacığın oluşmasına neden olur. Böylece analitler gaz fazında kalır. Ayrıca damlacıklar küçülürken pH değerleri düşer ve analitlerin protonlanması kolaylaşır. Bu iyonlaşma işlemi sonunda oluşan iyonlar genelde birden daha büyük yüklere sahip olurlar (+2, +3, +4 gibi).



Şekil 1.6 Yüklü damlacıkların bölünmesi

1.3 Kütle Analizörü

Kütle analizörünün işlevi, aynı fotonların dalga boylarına göre ayrılmasına benzer şekilde, yüklü molekülleri *kütle/yük* oranlarına göre ayırmaktır. Kütle spektrometreleri, kütle analizörünün yapısına bağlı olarak sınıflara ayrılabilirler.

Yüklü moleküller kararlı değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmanlarına parçalanıp yüklerini kaybedebilirler. Oluşan her bir iyon spesifik moleküler kütle ve yüke sahiptir. Bu değerlerin kütle/yük şeklinde absorbansa karşı grafiğe alındığı bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır.

Her bir iyonun absorbansı dedektöre ulaşan miktarı ile doğru orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum, referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanmayapılmaya çalışılır (Hoffman 2007).

1.4 Uçuş Zamanlı Analizör TOF (Time of Flight)

TOF analizörü birincil olarak, elektrik alandaki hızlarına göre uçuş tüpünde ayrılmış olan iyonları ayırır. Plazma veya lazer sayesinde ya da ihtiyaç duyulan potansiyelin odaklama lenslerine uygulanmasıyla, iyonlar kaynaktan yığınlar halinde çıkar. Bu iyonlar daha sonra farklı potansiyellerde yüklenerek uçuş tüpüne doğru hızlandırılırlar. Bütün iyonlar aynı kinetik enerjiye sahip oldukça, iyon kütlelerinin bir dağılımı olarak iyon karakterizasyonu *iyon hızı dağılımına* bağlıdır. Hızlandırma alanından ayrıлып serbest alana (uçuş tüpüne) giren iyonlar, burada hızlarına göre ayrıldıktan sonra da dedektöre ulaşırlar (Hoffman 2007).

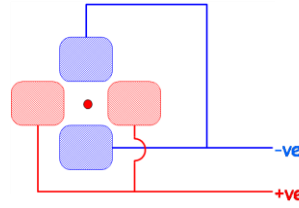
Yüklü moleküller yüksek bir elektrik alan ile hızlandırılarak, tüm kütlelerin aynı ilk enerjiye sahip olması sağlanır. Bu iyonlar daha sonra şekil 1.7'deki *uçuş tüpü* denilen yaklaşık 1-1,5 metre uzunluğundaki bir tüp boyunca uçarlar. Hepsi aynı ilk enerjiye sahip olmasına rağmen hafif olan moleküller daha hızlı; ağır olan moleküller daha yavaş hareket ederler. Dedektöre ulaşma zamanlarına göre de kütleler tespit edilir. Böylece kütle analizi yapılmış olur. TOF analizörü, MALDI veya ESI iyonlaştırıcıları ile birleştirilerek de kullanılır.



Şekil 1.7 İyonların m/z değerlerine göre farklılaşan hız değerleri sonucu birbirlerinden ayrılması

1.5 Kuadrapol

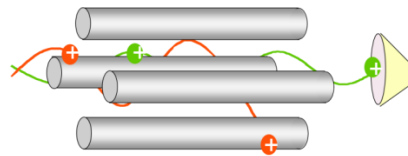
Kuadrapol, trajektörlerin kararlılığını elektrik alanda kullanarak iyonların m/z oranlarına göre ayrılmasını sağlayan cihazdır. Çubuklara yüksek voltaj ve radyo frekansı uygulanır. 2D ve şekil 1.8’de görülen 3D iyon tuzakları aynı mantıkla geliştirilmiştir. Alan çubukları tamamen paralel olmalıdır. Paralel alan çubuklarının arasından geçen pozitif bir iyon, negatif çubuğa doğru yönlendirilir. Eğer potansiyel yük boşalmasından dolayı değişirse, iyonun gidiş yönü de değişir (Hoffman 2007).



Şekil 1.8 Kuadrapolün yapısı

Kuadrapol gerçek bir kütle-yük ayırıcıdır. İyonların kaynağı terkettikleri sırada sahip oldukları kinetik enerjiden etkilenmez. Önemli olan iyonların analizörü geçme süresi ve ardı sıra gelen kütlelerin arasındaki zaman farkının doğru saptanmasıdır. Ayrıca iyonların alan çubukları arasında alternatif alan yaratacak kadar kalması sağlanmalıdır.

Uygulanan her voltaja karşılık sadece belli bir kütle/yük oranına sahip molekül uçuşunu tamamlayabilir; diğerleri çubuklara çarpar, alandan saparve uçuşunu tamamlayamaz (Hoffman 2007).



Şekil 1.9 Kuadropalde uçan iyonlar

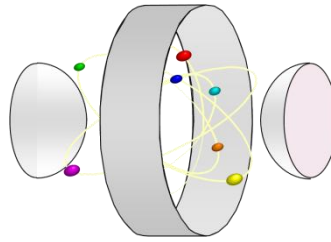
1.6 İyon Tuzağı

İyon tuzağı, değişken elektrik alan yaratarak iyonları tutmaya yarar. Bu cihaz radyo frekansı ile kuadrapol alan yaratarak iyonları iki ya da üç boyutta hapseder (Hoffman 2007).

İki tane halka elektrot içerir. İyonlar bu tuzağa gelir ve sonra dedektöre fırlatılırlar.

Tuzağa gelen iyonlar belirli bir yörüngeye sahiptir. Kütle/yük oranına bağlı olarak, bu yörünge tuzakta iyonlar daha az veya daha fazla boşluk işgal ederler. Yeterli iyon biriktiğinde, halka elektrotta uygulanan radyo frekans genişliği değiştirilerek, iyonların seçimli olarak Şekil 1.10' da gösterildiği gibi tuzaktan fırlatılması sağlanır. Yeşil renkli iyonlar uygulanan voltaja karşılık gelen kütle/yük oranına sahiptir.

Çeşitli radyo frekans uygulamaları iyonları tuzağın merkezinden ileriye doğru fırlatarak, özgül iyon yörüngelerinde dengesizlikler oluşturur ve en sonunda da dedektöre doğru fırlatır. Yüksek kütle/yük iyonları yüksek radyo frekans genişliğe ihtiyaç duyarken, düşük kütle/yük iyonları daha düşük bir radyo frekans genişliğinde fırlatılırlar. Şekil 1.10'da gösterilen iyon tuzağında, iyonlar birbirlerini ittikçe, trajektörler zamanın bir fonksiyonu olarak genişler. Bu genişlemeyle meydana gelen iyon kaybını engellemek için trajeksiyonu azaltmak gerekir. Bu da helyum gazı basıncının, fazla enerjiyi, iyonları parçalayarak yok etmesiyle sağlanır (Hoffman 2007).



Şekil 1.10 İyon tuzağına yakalanan iyonlar

1.7 Dedektör

Optik sistemlerde bulunmayıp kütle spektrometrelerinde bulunan karakteristik özellik, sinyal işleme ve gösterge kısımları hariç, cihazın diğer bütün bileşenlerinde sağlanmış ileri vakum (10^{-4} – 10^{-8} torr) sistemidir. Yüksek vakuma olan gereksinim, yüklü parçacıklar ve elektronların atmosfer bileşenleriyle etkileşip yok olması probleminde kaynaklanır.

Yüklü moleküller, dedektöre çarptığında sinyal oluştururlar. Sinyaller belirlenip ileri aşamalar için veriyi bilgisayara aktarır.

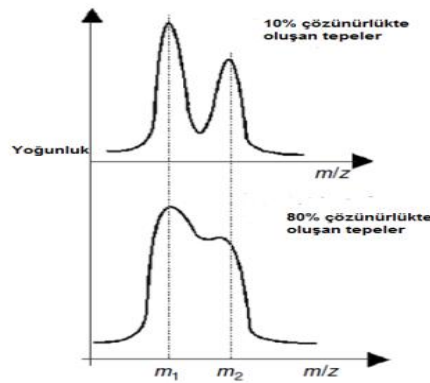
1.8 Veri

Dedektörde okunan sinyaller, görsel bilgiye spektrum şeklinde dönüştürülür. Spektrum incelenerek ise veriler geliştirilir. Herhangi bir yorum yapılmadan önce, mevcut bilgi kütüphanesinden, eldeki spektrumun herhangi bir bileşiğe ait olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bilinmeyen bileşiğin karakterizasyonu bu aşamada toplanan verinin kalitesine ve karşılaştırılabilirliğine bağlıdır. Veri spektrumu elde edildiğinde, araştırmanın başarılı bir şekilde sonuçlandığı düşünülse de, bazı yakın izomerlerin benzer kütle spektrumuna sahip olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Nadiren de farklı bileşiklerin spektrumları benzer çıkabilir. Bu konuda aydınlatıcı üç ana bilgi kütüphanesi vardır. İlki, 163,000 bileşiğin 190,000 spektrumunu içeren NIST/EPA/NIH spektral kütle bilgi kaynağıdır. Bu orijinal koleksiyon National Institute of Standards Technology (NIST) tarafından, Environmental Protection Agency (EPA) ve National Institutes of Health (NIH) yardımlarıyla oluşturulmuştur.

McLafferty ve Stauffer, *The Wiley Registry of Mass Spectral Data* adındaki 380,000 spektrumun bulunduğu yaklaşık 200,000 bileşiğin verilerini içeren bilgi koleksiyonunu geliştirmişlerdir. Bu veri tabanı en geniş kütüphanedir. Diğer bir veri tabanı ise, *Eight-Peak Index of Mass Spectra* adındaki ve Mass Spectrometry Data Centre of the Royal

Society of Chemistry tarafından kurulan, 65,000 bileşiğin 81,000 spektrumunu içeren bilgi tabanıdır.

Kütle spektrumu pek çok analitik bilgiyi içermektedir. İlki *moleküler kütle*; çünkü iyonizasyon teknikleri ile hemen her bileşiğin kütle bilgisine ulaşmak mümkün olmaktadır. Kütle spektrometresi ile *ölçülen kütle (kesin kütle)*, bileşikteki her atomun ortalama atomik kütleleri kullanılarak hesaplanan *ortalama kütle* ya da elementlerin doğada en çok bulunan izotopunun *monoizotopik kütleleri* ile hesaplanan *gerçek kütle* ile karşılaştırılabilir. Kütle spektrometresi ile hesaplanan kütle, analizörün çözünürlüğüne bağlıdır. Esas olarak cihaz, izotopları ayırtetmede iyi değilse, izotop kümesindeki pek çok pik birbirine kolayca karışabilir. Bu nedenle, cihaz tarafından saptanan kütle ortalama kütle ile alakalıdır. Bazan ortalama kütleyle bile makul kesinlikte hesaplamak zordur. Diğer yandan, rezolüsyon iyon kümelerindeki kütleleri birbirinden ayırarak kadar yüksekse; cihaz tarafından hesaplanan kütle, monoizotopik kütleler yardımıyla hesaplanan kütleyle çok yakındır. Ayrıca yüksek rezolüsyon, yüksek kesinliğe sahip olan dar alanlı piklere öncülük eder. Şekil 1.11’de rezolüsyonun yüksek ve düşük olduğu analizlerde piklerin ayırt edilmesi karşılaştırılmıştır. Rezolüsyonun optimum olduğu koşullarda, yakın değerlere sahip olan pikler bile farklı tepe noktalarına sahip olduğu için analizi kolaylaştırır.



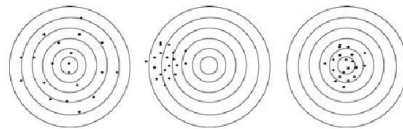
Şekil 1.11 Pik çözünürlüğü ve tepeler arasındaki ilişki

Diğer bir yardımcı bilgi, elementin kompozisyonuyla ilgili olan analitik bilgidir. Gerçekte kesin kütle ölçümü, tüm element kompozisyonunun eksiksiz saptanmasını

gerektirir. Bu yöntem genel olarak ‘yüksek rezolüsyon’ olarak adlandırılır. Bu da her zaman mümkün değildir. Spektrumdaki diğer elementler, sadece fragmantasyon eseri olsalar bile, daha fazla bilgi sağlarlar; en azından element kompozisyonu hakkında fikir verirler (izotopik bolluk, küçük fragmanların kütleleri vs). Öncelikle kaba bir formül geliştirildiğinde ya da bir kısmı doğrulukla bilindiğinde, yapının geri kalanı bulunmaya çalışılır (Hoffman 2007).

Rezolüsyon, bir analizörün farklı pik sinyallerini başka bir deyişle m/z farklarını ayırt etme kabiliyetidir. Kütle doğruluğu yüksek derecede analizörün rezolüsyon kararlılığına bağlıdır. Düşük rezolüsyonlu bir cihaz yüksek doğruluğa ulaşamaz. Analiz edilen örneğin kütlesinin hassas bir şekilde tayin edilmesi için piklerin merkezinin saptanması gerekir (Hoffman 2007).

Tepeleri arası yakın olan iki pik, pik yoğunluğu 10% iken ICR’da (ion cyclotron resonance; iyon hızlandırıcı rezonans), %50 iken kuadropol, QToF ya da iyon tuzağında ayrıştırılabilir. Eğer kütle farkı küçük ise, rezolüsyon gücü $R=m/\Delta m$ şeklinde ifade edilir. Bu şekilde artan rezolüsyon gücü, kütleler arası küçük farklılıkları ayırt etme yeteneğini de artırır. Rezolüsyon gücü ayrıca izole edilmiş bir pik ile de saptanabilir. Eğer iki pik %50 yükseklikte çakışıyorsa, tepe %100’dür. Bu nedenle rezolüsyonun hesaplanan R değerinden büyük olması gerekir. Buradaki önemli nokta, ayrılmış pikleri analiz etmek için gereken rezolüsyon gücü, R’den direk olarak bulunamaz. Düşük ya da yüksek rezolüsyon genellikle analizörün gücünü tanımlamak için kullanılır. Yine de belli bir tanım aralığı yoktur; çünkü her cihaz kendine has prensiplere sahiptir. Tepeler arasındaki uzaklık ne kadar fazlaysa kütle çözünürlüğü o kadar iyidir. Kütle doğruluğu ise, gerçek kütle ve ölçülen kütle arasındaki farktır. Şekil 1.12’de bu iki tanım arasındaki ilişki açıklanmaktadır (Hoffman 2007).

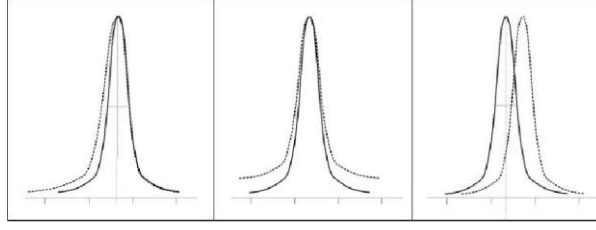


Şekil 1.12 Kütle çözünürlüğü ve kütle doğruluğu arasındaki ilişki

En soldaki şekildeki dağılımda, düşük hassasiyet vardır; fakat noktalar hedef etrafında kümelendiğinden doğruluk değerleri iyidir. Ortada şekildeki dağılıma göre, hassasiyet daha iyidir; fakat merkezden uzaklaştığından dolayı doğruluk kötüdür. Sağdaki şekildeki dağılımda ise, hem hassasiyet hem de doğruluk iyidir.

Kütle spektrometreleri, iyonların ve izotoplarının kütlelerini, elementel kompozisyonlarını açıklayacak şekilde ölçer. Doğru kütle ölçümü, toplam kütle hatasını gösterir ve elementel kompozisyonu belirlemede kolaylık sağlar. Kütle arttıkça çözünürlüğün gerekleri de artar; çünkü her element oldukça farklı kütle hatasına sahiptir. Atomların sayısı arttıkça kütle değerleri yakın olan olası kombinasyonların sayısı da artar. Örneğin; $C_{24}H_{19}N$ ve $C_{21}H_{23}N_5$ bileşiklerinin kütleleri sırasıyla 321.1517u ve 321.1551u'dur.

Doğru kütle saptanması ve çözünürlük gücü arasındaki ilişki iyi anlaşılmalıdır. Doğru kütle düşük çözünürlükte saptanabilir, ancak iyi izole olmuş bir pik olması gerekir. Bu da saflığı yüksek bir bileşiğin yüksek kalitede bir spektrumunun olduğunu gösterir. Spektrum yüksek saflıktaki bir bileşiğe aitse, kütlesi 100 u'dan bile az olan fragmanların elementel kompozisyonunu saptamak kolaydır. Fragmanların elementel kompozisyonu bilinirse parçalanma mekanizması ve kimyasal yapının tahmini de kolaylaşır. Pikler karışımına sahip olmanın riski, farklı elementel bileşimdeki bileşiklerin aynı nominal kütleyle sahip olmasından ileri gelir. Yüksek çözünürlük seçiciliği arttırdığı gibi karışımların ya da fragman iyonların piklerinin karışımlarının oluşması riskini de azaltır. Bileşik saf ise rezolüsyon düşük olsa bile kütle yüksek doğrulukta belirlemek mümkündür. Diğer önemli bir gereksinim ise elementel kompozisyonu açığa kavuşturmak için izotopik pikler hem benzer miktar hem de kütle doğruluğu yönünden iyi belirlenmelidir. Bunun için düşük zemin gürültüsü ve çok iyi sinyal-gürültü oranı gereklidir. Kısacası iyi iyon istatistiği ve dinamik dağılım önemlidir (Hoffman 2007).



Şekil 1.13 Üst üste pikler-deneyisel pikler

Kütle belirlenirken meydana gelen bazı sorunlar kesinliği değiştirirler. Şekil 1.13’de düşük gürültüdeki sinyaller kullanılarak karışabilecek pikler gösterilmiştir (Hoffman 2007).

Gerçek kütlelerin saptanmasındaki bazı hatalar;

1) Pikin simetrik olmaması

a) Spektrometre bozuk olabilir. Bu durumda tüm pikler benzer kütle bölgesinde bir karışıklığa sahiptir. Bunlar kalibrasyonla düzeltilebilir. Eğer başarılı olunamıyorsa yazılım ile matematiksel bir çözüm üretilmelidir.

b) Pik aslında benzer kütleli birden fazla kimyasaldan oluşuyordur. Bu sorun sadece bu pikte görülür. Örnek saflaştırılarak bu sorun aşılabilir; ya da yüksek çözünürlük kullanılır.

2) Pikin genişlemesi zemine çok yaklaşır ve doğruluğun merkezi değişir. Daha da fazlası dedeksiyon limiti düşer ve merkez küçük piklere kayar. Zemin gürültüsü genellikle kirlilikten ve zayıf iyon istatistiğinden kaynaklanır (Hoffman 2007).

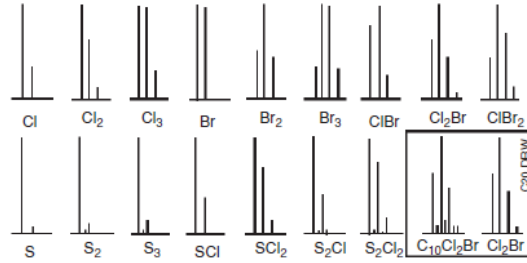
Dedeksiyon limiti duyarlılık ile karıştırılmamalıdır. Bu terim, zemin gürültüsünden ayırt edilebilen ve bir sinyal yaratan en küçük miktardaki örnek anlamına gelir (Hoffman 2007).

Çoğu element doğada izotoplar karışımından oluşur. Bu izotoplar piklerde izotopik kümelenmelere neden olur. Bu nedenle izotopik bolluk, kütle belirlenmede önemli bir yere sahiptir. Çizelge 1.1’de elementlerin sahip oldukları izotopların doğadaki bollukları gösterilmiştir. Şekil 1.14’de de farklı izotoplardan dolayı bir elementin sahip olabileceği

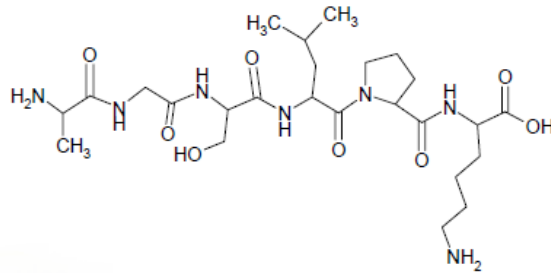
izotopik kütleler verilmiştir. Çerçeve içinde gösterildiği gibi bağlantılı olan diğer atomlar da hesaba katılmalıdır (Hoffman 2007).

Çizelge 1.1 Elementlerin izotopik bollukları

İzotop	Bağıl bolluk (%)	Kütle (u)	Hesaplanan	Ölçülen
¹ H	99.985	1.007 825	1.007 976	1.007 94
² H	0.015	2.014 0		
¹² C	98.90	12.000 000	12.011 036	12.011 1
¹³ C	1.10	13.003 355		
¹⁴ N	99.63	14.003 074	14.006 762	14.006 74
¹⁵ N	0.37	15.000 108		
¹⁶ O	99.76	15.994 915	15.999 324	15.999 43
¹⁷ O	0.04	16.999 131		
¹⁸ O	0.20	17.999 160		
¹⁹ F	100	18.998 403	18.998 403	18.998 4
²³ Na	100	22.989 767	22.989 767	22.989 76
³¹ P	100	30.973 762	30.973 762	30.973 76
³² S	95.02	31.972 070	32.064 385	32.066 6
³³ S	0.75	32.971 456		
³⁴ S	4.21	33.967 866		
³⁶ S	0.02	35.967 080		
³⁵ Cl	75.77	34.968 852	35.452 737	35.452 79
³⁷ Cl	24.23	36.965 903		
³⁹ K	93.2581	38.963 707	39.098 299	39.098 31
⁴⁰ K	0.0117	39.963 999		
⁴¹ K	6.7302	40.961 825		
⁷⁹ Br	50.69	78.918 336	79.903 526	79.904 1
⁸¹ Br	49.31	80.916 289		



Şekil 1.14 Kütle spektrometresinde faydalı izotop kümeleri

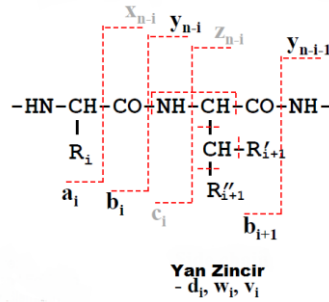


Şekil 1.15 Örnek peptit: AGSIPK

Peptitler, uçucu olmayan ve çoğunlukla bazik özellik gösteren moleküllerdir. Yumuşak iyonizasyon teknikleriyle kolayca iyonize olurlar;



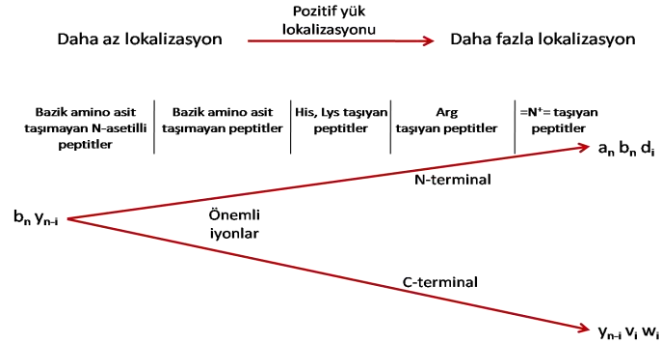
Protonlanma bazik aminoasitlerin (lizin, arginin, histidin) ve N-terminal uçların proton moleküllerine olan ilgisiyle meydana gelir. Peptit zincirinde bazik kısımlar; N-terminal uçtaki amino grubu, lizin yan zinciri, arginin ve guanidin gruplarıdır. Beş aminoasitten uzun olan peptit zincirlerinde amit karbonili tarafından proton şelatlanması ve N-terminal tarafından çekilmesi yarışan reaksiyonlardır. Bazik olmayan peptitlere ise Na⁺ iyonu daha kolay yaklaşır.



Şekil 1.16 Peptit parçalanmasında ortaya çıkan major iyonlar

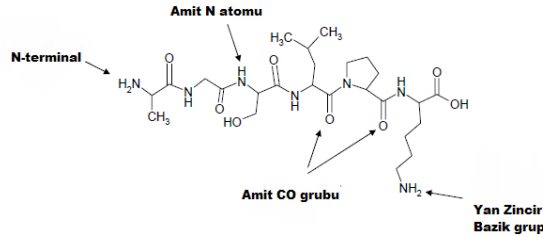
Yüksek enerjili parçalanmalarda yan zincir iyonları ortaya çıkar. Şekil 1.16'da bir peptit zincirinin kopma olan bağa göre oluşturacağı iyonlar gösterilmiştir.

Peptit ana zincirindeki parçalanmalar üç çeşit bağdan meydana gelir; C α -C, C-N veya N-C α . Buradan altı çeşit iyon oluşur; pozitif yük N-terminal ucunda tutulursa x_{n-i}, y_{n-i}, z_{n-i}; pozitif yük C-terminal ucunda tutulursa a_n, b_n, c_n. Peptitlerde terminal amino grupları baziktir. Protonlanma daha çok bazik kısımlarda gerçekleşir. Bazik amino asitin yeri peptitin parçalanmasını etkiler. Arg, Lys, His veya Pro gibi bazik amino asitlerin C-terminalde bulunması, C-terminal içeren iyonların (y_{n-i}, v_i, w_i) oluşmasını teşvik eder. Aynı şekilde bu iyonlar N-terminal uçta ise, N-terminal içeren iyonların oluşumu (a_n, b_n, d_i) daha çok gözlenir. Şekil 1.17'de peptit içeriğine göre oluşan iyonlar şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.17 Peptitin yapısına göre yük ve parçalanma

CID düşük enerjili peptit parçalanmasında, iyonların çoğunluğu amit bağındaki CO-NH'den gelir. Baskın olan iyonlar b ve y iyonlarıdır. Daha sonra bu iyonlar yan zincirlerdeki fonksiyonel gruplardan su ve amonyum gibi küçük molekülleri kaybederler. Prolin amino asiti istisnai bir duruma tabidir; 5 atomlu bir zincir parçasındaki imino grubu, diğer amit bağlarına göre protona daha fazla afinite gösterir. Bunun sonucunda protonlanma ve parçalanma prolin amit bağında gerçekleşir ve prolinde C-terminal uca uzayan bir iç iyon oluşur.



Şekil 1.18 İlk adım-peptitlerin protonlanması

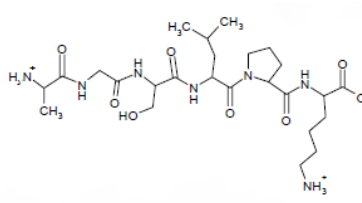
Şekil 1.18'da gösterilen peptitdeki protonlanma olasılığını baziklik ile orantılı olarak sıralarsak; yan zincir bazikliği > N-terminal > Amit CO grubu > Amit N atomu

Peptit parçalanmasının ana yolları;

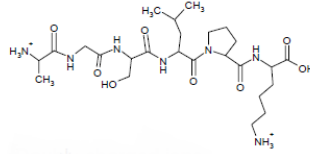
-Yükün yönetmesi (charge remote): Düşük enerjili parçalanmada önemlidir. Asp ve Glu parçalanmayı yönlendirir ve oksitlenmiş Met yan zinciri parçalanır.

-Yükün yönlendirilmesi (charge directed): Ana parçalanma yoludur. Sekans karakterizasyonu $-b_x-y_z$ iyonları temellidir ve küçük moleküller kaybolur.

Yük yönlendirmesinin baskın olduğu parçalanmada, hareketli proton modeli, şekil 1.19’de gösterildiği gibi Arg ve Lys yan grupları en bazik kısımlardır. Proton ilk olarak buralara bağlanır. Şekil 1.20’de çift proton bağlı peptit zinciri gösterilmiştir. Protonlardan biri sabit iken diğeri hareket ederek yükün dengelenmesini sağlar.

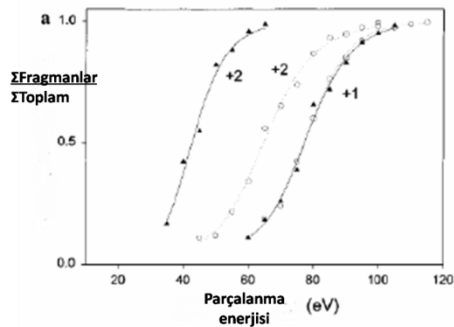


Şekil 1.19 Lys veya Arg ile tek yüklü iyonlar; protonun hapsedilmesi



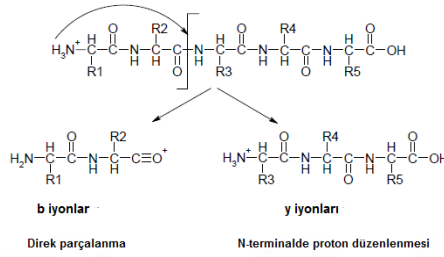
Şekil 1.20 Çift yüklü iyonlar; 2. protonun hareketi yönlendirmesi

Çizelge 1.2 Parçalanma ve parçalanma enerjisi arasındaki ilişki

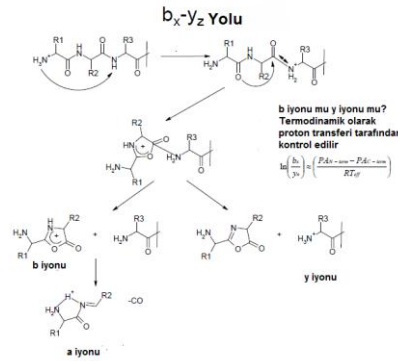


Çizelge 1.2’ de parçalanma enerjisi CE ve parçalanma arasındaki ilişki irdelenmiştir. Çizelgeye göre, enerji arttıkça oluşan iyon sayısı da artar; çünkü büyük iyonlar

parçalanarak çok sayıda küçük iyon oluştururlar. Şekil 1.22’de sulu halde iyonik olan bir peptit zincirinin parçalanıp daha küçük iyonik zincirler oluşturması gösterilmiştir. Şekil 1.21’de bu parçalanma ürünlerinin tekrar parçalanıp daha da küçük iyonik kısa peptit zincirleri oluşturması gösterilmiştir.



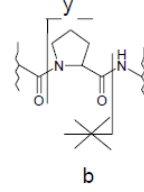
Şekil 1.21 Normal şartlarda oluşan fragman iyonlar



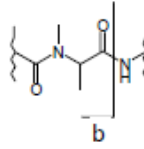
Şekil 1.22 Yük yönlendirildiği zaman oluşan iyonlar

Aminoasit kalıntılarının çeşitleri, parçalanmaya etki etmektedir. Bu açıdan bilinen en iyi örnek Prolin aminoasitidir. Prolin bulunan kısımlarda, özellikle Pro kalıntısı uç kısımlara yakınsa, zincir her zaman N-terminal uçtan parçalanır (şekil 1.23). NMeAla bulunan kalıntılarda ise tam tersi olarak C-terminal uçtan parçalanma gözlenir (şekil 1.24). Pipecolinic asit ise Pro aminoasitine benzer özellik göstererek N-ter uçtan parçalanma verir (şekil 1.25). Sterik engel ve artan baziklik daha çok Pro etkisi görülmesine neden olur. *Histidin Etkisi* olarak tanımlanan durumda ise çoğunlukla b-iyonları oluşur, yani N-ter uçtan parçalanma gözlenir (şekil 1.26). Asp ve Glu da

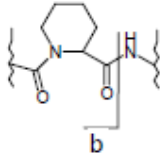
genellikle yük etkisiyle parçalanmayı destekleyici rol oynarlar (şekil 1.27). Ayrıca şekil 1.28'da görüldüğü gibi bir peptidin herhangi bir kalıntısından protonlanması da parçalanmaya itici güç oluşturur. Bu durum asidik ortamda kolaylıkla gerçekleşir.



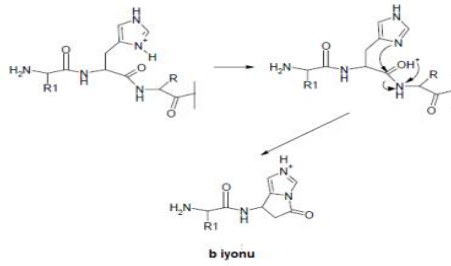
Şekil 1.23 Prolin etkisi: parçalanmanın N-terminal uçtan gerçekleşmesi



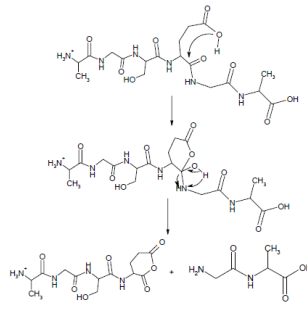
Şekil 1.24 NMeAla etkisi: parçalanmanın C-terminal uçtan gerçekleşmesi



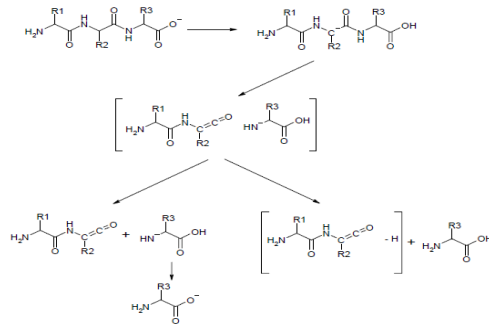
Şekil 1.25 Pipecolinic asit



Şekil 1.26 Histidin etkisi



Şekil 1.27 Aspartik asit ve Glutamik asit etkileri: yük etkisiyle parçalanma



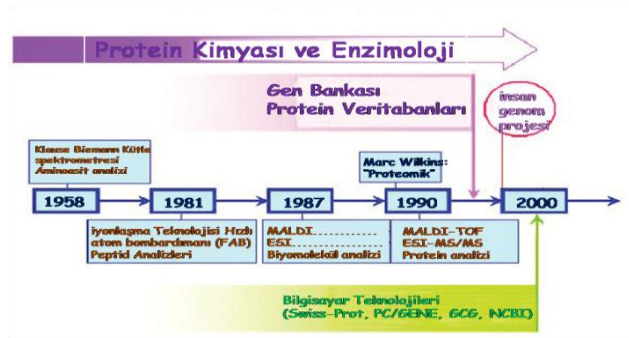
Şekil 1.28 Deprotone olmuş peptitlerin parçalanması [M-H]⁻

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Protein Çalışmaları

Proteom, bir organizma ya da dokunun genomu tarafından ifade edilen proteinlere verilen addır. PROTEin ve genOM sözcüklerinin bileşiminden oluşmuştur. Proteom sözcüğü ilk kez 1994'de Marc Wilkins tarafından önerilmiş, 1995 yılında literatürde yerini almıştır.

Proteomik olarak tanımlanan proteom analizi, proteinlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesini ve işlevlerinin aydınlatılmasını kapsar. Protein analizi DNA analiziyle karşılaştırılmayacak kadar zordur. DNA yalnızca dört yapı taşından oluşurken doğal proteinler 20 farklı aminoasitten oluşur ve üç boyutlu yapıları işlevlerini etkiler.



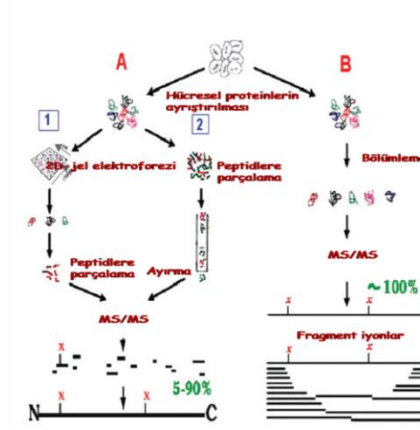
Şekil 2.1 Proteom analizinin tarihsel gelişimi

2.2 Proteom Analizinin Önemi

Proteom analizleriyle, hastalıkların gelişim süreçlerini de kapsayan birçok biyolojik olay ile proteinlerin yapısal ve işlevsel çeşitliliği arasında ilişki kurularak, sağlıklı ve hastalıklı durumlarda farklılaşan proteinler belirlenebilir. Bu proteinlerin belirlenmesiyle de kanser, kalp damar hastalıkları, hemofili ve osteoartrit gibi birçok hastalıkta daha iyi sonuçlar veren teşhis ve tedavi yolları geliştirilip yeni ilaçlar üretilebilir.

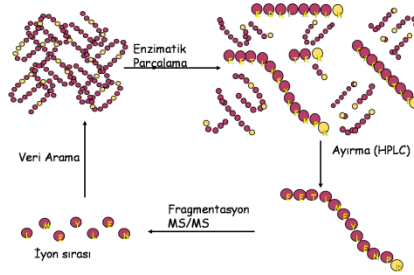
Proteom analizlerinin karmaşık yapısı nedeniyle çok güçlü analitik tekniklere ihtiyaç vardır. Genel olarak kullanılan teknikler;

- Tek ve iki boyutlu (2D) elektroforez
- Kapiler elektroforez
- Kromatografi
- Ultrafiltrasyon teknikleri
- Spektroskopik teknikler



Şekil 2.2 Peptit yapısının aydınlatılmasında bir dizi analiz

Şekil 2.2' ye göre, örnekte yer alan proteinler belirtilen teknikler kullanılarak ayrılır ve her bir protein kütle spektroskopisiyle analiz edilir. Saflık derecesi yüksek olduğu zaman %100 MS analizinden %100 verim alınabilir. Peptitlerin analizinde şekil 1.32'de gösterilen amino asit dizi analizi esastır.



Şekil 2.3 Bir peptidin dizi analiziyle sekansının belirlenmesi

Kütle spektroskopisi, proteinlerin tanımlanmasında oldukça etkili bir yöntemdir. Sonuçlar bize şu konular hakkında bilgi verir;

- Protein dizileri
- Posttranslasyonel modifikasyonlar
 - ❖ Fosforilasyon
 - ❖ N- veya C- terminal modifikasyonları
 - ❖ Glikozilasyon
- Proteinler arası ilişkileri

2.3 Proteinlerin Birincil/Primer Yapıları

Proteinlerdeki aminoasit dizilimine *primer yapı* denir. Aminoasitlerin sayısı ve sırası, o proteinin üç boyutlu yapısını ve fonksiyonunu tayin eder. Primer yapı bir amino asitin karboksil ucu ile diğer amino asitin amino ucu arasında peptit bağı oluşmasıyla meydana gelir. Oluşan zincirler önce sekonder yani ikincil yapı kazanır. Daha sonra çeşitli şekillerde katlanıp kıvrılarak küçük bir hacim kaplayacak şekilde doğal üç boyutlu yani tersiyer yapı oluşur. Üç boyutlu yapı kazanmada, yan zincir grupları etkilidir. Hidrojen bağları, disülfür bağları, iyonik etkileşmeler, hidrofobik etkileşimler ve polar etkileşimler yapıya dayanıklılık kazandırır.

2.4 Metaller ile İlgili Çalışmalar

Dawnward vd (1994)'de yaptıkları çalışmada, elektrospray iyonizasyonu ile yaratılan tek ve çift yüklü iyonların CID spektrumu, basit primer yapıya sahip olan peptitler ile karşılaştırılmıştır. Yüksek baziklikte amino asit içeren peptitlerde, çift yüklü iyonların dağılımı, aminoasit kalıntılarının peptit zincirindeki yerlerine bağlı olduğu gösterilmiştir. Tek yüklü iyonlar yüksek enerjili hale geçilerek ürünler oluşturmuştur. Çift yüklü peptitlerin öncül iyonlar oluşturma davranışlarına bakıldığında, bazik kısımların yoğun olması koşuluyla bu iki yük yeni oluşan iyonlarda itme kuvvetlerini yenerek yakın yerlerde bulunabileceği gösterilmiştir. Ayrıca çift yüklü iyonların

varlığında CID spektrumundaki kütle-yük oranına bakılarak bazı fragman iyonların yükleri hesaplanabilmiştir.

Gonzales vd (1996)'da yaptıkları çalışmaya göre, peptitler sekanslarına göre fragmanlarına ayrılmışlardır. N-terminal uçtan gelenler x, y, z, v, w ve C-terminal uçtan gelenler a, b, c, d olarak adlandırılmıştır. d, v, w iyon serisi CID yüksek enerjisinde yan zincirleri belirlemiştir. N-terminal iyonlar, N-terminal bazik uç olduğu zaman öne çıkmıştır. C-terminal uça baziklik var ise, C-terminal uçlar daha öne çıkmıştır. Sadece Arg aminoasitinin yeri değiştirilmiş ve diğer bileşimleri aynı olan peptitler üzerinde çalışma yapılmıştır. Arg genellikle C-terminal uça bulunur. Arg'in C-terminal olmadığı bütün peptitlerin $[b_4+H_2O]$ iyonunu oluşturduğu görülmüştür. Bu iyon en çok Arg'in (n-1) olduğu peptitte görülmüştür. Metal ile kationize olmuş (protone olmamış) ve bazik aminoasit bulundurmayan peptitlerde, alkali metallerin C-terminaldeki COO anyonu ile etkileşime girdiği görülmüştür. C-terminal COOH grubundaki OH'ın, (n-1) kalıntısındaki karbonil grubuna nükleofilik atağı sonucu bu durum görülmüştür. Fakat Arg varlığında, protone olmuş guanidin C-terminalindeki COO ile sondan bir önceki karbonille etkileşen bir tuz köprüsü oluşturmuştur.

Zhou vd (1996)'da yaptıkları çalışmada, çözücünün buharlaşması ile yüklü damlacıkların küçüldükçe büyüyen kütle/yük oranına sahip olduğu görülmüştür. Uçucu olmayan iyonik tuz çözeltisi yoğunlaştırıldığında, buharlaşma prosesindeki iyon ayrımı tamamlanmamıştır. Ayrılmamış elektrolit iyonları son damlada tek bir iyon gibi kalıp pek çok iyon grubunun oluşumuna sebebiyet vermiştir.

Sodyum tuzu ile yapılan çalışmada, sodyum tuzu çözeltisinden kaynaklanan sodyum iyon grupları, konsantrasyonun 0.25 mM'dan yüksek olduğu elektrosprey koşullarında oluşmuştur. Düşük sodyum iyonu konsantrasyonlarında (50 μ M) en baskın iyon kümeleri $Na^+(CH_3CN)_n$ dir. Koni voltajı 30-35V olduğu aralıkta yalın bir şekilde Na^+ iyonu görülmemiştir. Koni voltage 55V' den yüksek olduğunda $Na^+(CH_3CN)_n$ kümeleri ortaya çıkmıştır. Sodyum asetat konsantrasyonu 250 μ M'dan büyük olduğu zaman $Na^+(CH_3COONa)_{n1}(HCOONa)_{n2}$ iyon kümeleri belirmiştir. Sadece sodyum format varlığında n değerinin 1-20 arası değiştiği $Na^+(HCOONa)_n$ iyon kümeleri ortaya

çıkıştır. Düşük Na tuzu konsantrasyonlarında (<250µM), Na⁺katyonu, iyon kümesinden ayrılmıştır ve çok az sayıda iyon çifti damlada kalmıştır. Genellikle 100µM derişiminin iyon kümelerinin ortaya çıktığı kritik derişim olduğu görülmüştür. Damlaların ayrılması düzensizdir ve oluşturduğu damlalar kendisinden daha küçük olmakla beraber daha fazla iyon yoğunluğuna sahiptir. Tekrar tekrar ayrışmalar tek iyon yüklü damlacıklar yaratmıştır. Uçucu olmayan sodyum tuzları göstermiştir ki; püskürtülen akışın %80 MeCN içerdiği durumlarda Na⁺(NaCl)_n (n>4) ve Na⁺(CH₃CN)_n iyon kümeleri yoğunluktadır. Çözeltide mevcut olan klorun izotopik kütleleri bu iyonların saptanmasını kolaylaştırmıştır. Na⁺(CH₃CN)_n iyonlarının koni voltajı arttırıldıkça dengelendiği görülür. 55 V civarında Na⁺(CH₃CN)_n iyon kümesi ayrışırken 135V civarında hiçbir ayrışma gözlenmemiştir ve iyon kümesi şeklinde kalmıştır.

Wang vd (1996)'da yaptıkları çalışmaya göre, fragmanların oluşumunun peptitlerin protonlanmasından çok daha farklı olduğu görülmüştür. Özellikle sodyum ve potasyumun iyonik etkileşim yapması bunda önemli rol oynamıştır. Gaz fazında MS/MS modunda çalışırken, alkali iyonlar çözücü moleküllerin etkisi olmadan peptitlerle etkileşime geçmiştir. Tripeptitlerin su/metanol karışımı çözücüsünde ve pH 12 iken ESI çalışmasında, X-OH varken pek çok katyonik X-peptit iyonunun olduğu görülmüştür (X: alkali metal). Bu katyonları azalan miktarlarına göre sıralarsak; [M-H+2X]⁺ > [M-2H+3X]⁺ > [M-3H+4X]⁺ (M= tripeptit ve X = Li, Na veya K). Metal iyonları genellikle peptit zincirindeki karbonil oksijeni ile koordine olmuşlardır. Hatta C-terminal karboksilat (-COO⁻) anyonu ve peptitin N atomlarıyla etkileşmişlerdir. Nötral tripeptitler LGG ve GGV'nin, KOH içinde pH=12'deki negatif iyon modu ESI-MS çalışmasında, azalan miktarlarına göre [M-H]⁻, [M-2H+K]⁻ ve [M-3H+2K]⁻ iyonlarının deprotonasyonu azaltarak oluştukları görülmüştür. AGG, GGA, LGG, GGL, VGG ve GGV triptik peptitleri için ise, CID spektrumunda [M-2H+Na]⁻ iyonu saptanmıştır. Sadece tek tip çarpışma için koşullar ayarlanmıştır ve bu da sonuç olarak düşük iyon sayımına neden olmuştur. Büyük iyonlar için [x₁-2H]⁻, [b₂-2H]⁻, [y₂-H+Na]⁻, [y₂-H+Na+CO₂]⁻ iyonlarının varlığı birer kanıt olmuştur. Bu iyonlardan ilk üçü, altı tripeptitin hepsinde de görülen yapılarıdır. Son iyon ise, sekansın _GG olduğu tripeptitlerde ortaya çıkmıştır. Aynı ürün, GPA, APG ve PGG tripeptitlerinden oluşan [M-2H+X]⁻ iyonunun diğer alkali metallerle olan spektrumlarında da

görülmüştür. M=GGL ve X=Li, Na, K ve Cs iken, $[M-2H+X]^-$ iyonunun spektrumu Li'den Cs'ye doğru azalan oranlarda parçalanma göstermiştir (Li > Na ~ K > Cs); fakat tüm metaller için ortamda aynı iyonlar oluşmuştur. N-terminalin açılmesiyle $[M-2H+X]^-$ iyonunun parçalanmasında 2 farklı yol gözlenmiştir. AC-GGV için ana ürünler, iki yolda da $[x_1-2H]^-$, $[b_1-2H]^-$, $[x_2-3H+Na]^-$, $[x_2-HCOOH]^-$ ve $[c_1-H+Na]^-$ iyonlarıdır. Ac-VGG; $[y_2-H+Na]^-$ iyonu açığa çıkarmıştır. $[M-3H+2X]^-$ ana iyonu; AGG, LGG, VGG ve GGA, GGL ve GGV peptitleri için diğer bir fragmandır. Sadece bir çeşit ana ürün iyonu oluşturmuştur; $[y_2-2H+2Na]^-$. PPG için, $[M-3H+2X]^-$ öne çıkan iyon türlerinden bir tanesidir. GPA ve APG için bu iyon düşük yoğunlukta gözlenmiştir. Bu fragman yapıları, metalin çevresini saran tripeptit ile bir koordinasyon meydana getirmesiyle oluşur. Ana bağ karboksilat oksijeninden bir H kaybetmiş C-terminal amino asitin N atomuna doğrudur. Diğer koordinasyonlar elektron çiftine sahip olan diğer amit N atomları ile oluşmaktadır. Benzer yapılar 3 proton kaybetmiş ve iki metal atomu bağlanmış peptitlerde de ortaya çıkmıştır. Bir metal C-terminal karboksilat oksijenine bağlanarak tuz köprüsü oluştururken, diğeri arkaplanda koordine olmuştur. Diğer bir yaklaşım ise, C-terminal yerine ikinci kalıntıdaki N atomunun bir H kaybetmesidir. $R_1CH=NH$ yapısının oluşması ve CO çıkışı ile $[y_2-H+Na]^-$ iyonu ortaya çıkmıştır. Proton kaybetmiş R_3 , N atomuna, R_3 ise karboksilat O atomu üzerinden metal atomuna koordine olmuştur. N-açılmiş $[AcM-2H+X]^-$ iyon formu çok daha zengin fragman oluşumu içermektedir. Ana ürünler $[x_1-2H]^-$ ve $[y_2-H+X]^-$ iyonlarıdır. Diğer ürünler $[x_2-3H+X]^-$, $[x_2-HCOOH]^-$ ve $[c_1-H+X]^-$ iyonlarıdır. $[x_2-3H+X]^-$ ürünü oluşumu iyonik türden bir proton kaybederek nötral türe geçişle olmuştur. Eğer çift protonlanmış ana türden nötral türde bir iyon ürünü elde ediliyorsa, -NH- yapısından bir hidrojen (-CH- olmaz) bunda görev almıştır. Örneğin; R_2 amino asiti -NH- transferi ile $R_1CH_2NHC(O)CH_3$ oluşturmuştur. GPA ve APG, R_2 üzerinde -NH- grubuna sahip olmadığından bu tipte ürün vermemiştir. PGG peptitinde R_2 , -NH- yapısı olduğundan bu ürünleri verebilmiştir. $[x_2-HCOOH]^-$ iyonu PGG ve prolin barındırmayan peptitlerden meydana gelir. R_1 zincirinin -NH- grubu hidrojeninin R_1 üzerindeki β -C atomuna transferi ile oluşan $R_1CH=NCOCH_3$ yapısından, $[x_2-H+X]^-$ iyonu meydana gelmiştir. HCOOX eliminasyonu ile de $[y_2 - HCOOH]^-$ iyonu meydana gelmiştir. PGG peptitinde prolin halkasından bir -CH- grubunun H atomu, $[x_2-H+X]^-$ iyonunun oluşmasını ve prolin halkasının bozularak $[x_2-HCOOH]^-$ iyonu oluşturmasını tetiklemiştir. $[c_1-H+X]^-$

iyonu, R₂ üzerinde N-C bağının parçalanması ile oluşmuştur. Bu reaksiyon APG ve PGA için geçerli değildir. Prolin içermeyen peptitlerde beklendiği üzere d₂-[Ac-M-2H+X]⁻ iyonunun CID spektrumunda d₁-[c₁-H+X]⁻ iyonu görülmüştür.

Li vd (1997)'de yaptıkları çalışmaya göre, gümüş(I) iyonunun yumuşak ligandlara bağlanmayı tercih eden yumuşak bir katyon olduğu görülmüştür. Proteinlerdeki fonksiyonel yumuşak gruplar, sülfür iyonlu Met veya Cys aminoasitlerini içermektedir. Metal bağlı peptitlerin parçalanma yolu protone olmuş peptitlerinkinden çok daha farklıdır. Geçiş metallere bağlanması toprak ve toprak alkali metallere bağlanmasından farklıdır. Metal veya proton ile katyonize olan peptitler önce gümüş ile doyurulup daha sonra Cs metaline maruz bırakılmıştır. Sonuçlara göre, Ag⁺ iyonu N-terminal azot atomuna ve C-terminal O atomu ve ikinci kalıntıdaki karbonil O atomuna şelatlanmıştır. Oligopeptitlerin Co(II), Mn(II), Ni(II) ve Fe(II) iyonlarıyla yapılan çalışmalarında şelatlanmanın; N-terminal azot atomu, proton kaybetmiş amid azot atomu veya C-terminal COO⁻ anyonu üzerinden olduğu görülmüştür. Cys içeren peptitler ise Fe(II) iyonu ile etkileşmiştir. His ve anjiyotensinin karbonil O atomunun Zn(II) ile etkileştiği bulunmuştur. Cu(II) iyonu N- veya C-terminal uçlar aracılığıyla bağlanmıştır. GlyAlaAla peptitinden oluşan [M+¹⁰⁷Ag]⁺ ürününün spektrumuna göre, en çok Ag-ortaklaşmış ürünler gözlenmiştir. Bu iyon çeşitleri;

- [a_n - H + Ag]⁺
- [b_n - H + Ag]⁺
- [y_n + H + Ag]⁺
- [b_n + OH + Ag]⁺

İlk üç iyon türü, düşük enerjili parçalanmada ve tek gümüş iyonu bağlandığı peptitlerde gözlenmiştir. Son iyon türü ise, alkali metal içeren peptitlerin parçalanmasında görülmüştür. GlyMet dipeptitinden gelen [M+Ag]⁺ ürününün iyon spektrumunda; Ag, Met aminoasitinin S atomuna bağlanmıştır. Böylece amit bağı parçalanır ve S atomu içermeyen ve b₁ içeren N-terminal fragmanı oluşmuştur. [b₁+OH+Ag]⁺ iyonu m/z 182'de gözlenmiştir. Bunun anlamı, Ag⁺ iyonu, parçalanma sonucu oluşan N-terminal uca bağlanmıştır. S atomu düşük elektronegativiteye ve yüksek polarizasyona sahiptir. Ag(I), Au(I) ve Hg(II) iyonları sülfüre bağlanmaya isteklidir.

Rodriquez vd (2000)'de yaptıkları çalışmada Cu^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarının protonlarla yer değiştirdiği görülmüştür. Çözeltideki oligopeptitlerin amit protonu, N-terminal nitrojene ligand oluşturulduktan sonra indirgenir ve $[\text{M}-n\text{H}+m\text{X}]^{(m-n)+}$ tipindeki kompleks iyonlar ortaya çıkmıştır. UBQ (ubikinin), 76 kalıntısı bulunan ortalama 8564.9Da ağırlığında bir peptittir. Bu peptitin KOH ve KCl tuzları ile oluşturduğu spektrumu, $[\text{M}-(m-z)\text{H}+m\text{K}]^{z+}$ tipinde pek çok iyon ve iyon yük derecesi (z) olduğu görülmüştür. Potasyum, OH^- iyonuna Cl^- iyonuna göre daha kuvvetli bağlanır. K^+ sayısının hesaplanması şu bağıntı ile yapılır;

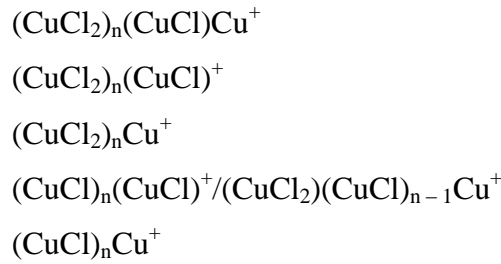
Klorür tuzu için m , 0-20 arasındadır. $m=5$, en yoğun olan iyon olarak gözlenmiştir. Hidroksit tuzu için m , 9-21 arasındadır. $m=14$, en yoğun olan iyon olarak gözlenmiştir. İyon kümelerinin yükü arttıkça, Cl ile K arasındaki etkileşim azalmıştır. Bunun nedeni UBQ peptidinin fonksiyonel gruplarının reaksiyon entalpilerinin farklı olmasıdır. KOH, KCl tuzuna göre daha fazla çeşitlilikte fonksiyonel grupla etkilşime girme eğiliminde olmuştur. NaOH ve NaCl tuzları arasında da bu tip bir benzerlik mevcuttur. Potasyum ürünlerinin sodyum ürünlerine göre kararlı olması, potasyumun yüksek kütleli kaynağıdır.

Loo vd (1994)'de yaptıkları çalışmada, anjiyotensinin (moleküler kütle=1296, DRVYIHPFHL), 2 adet His kalıntısına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca iki adet Zn bağlayabilen bir kalıntısı vardır. Kompleksin sitokiyometrisi $[\text{M}+a\text{Zn}^{2+}+(c-2a)\text{H}^+]^{c+}$ dir. Zn'nin pek çok izotopu vardır ve bunların her biri kütle spektrometresinde farklı parmakizlerine tekabül ederler.

Hao vd (2001)'de yaptıkları çalışmaya göre, protonlanmış su molekülü kümeleri ve NaF, KF, NaI, KI, RbI, CsI, CsNO_3 ve CsCO_3 kümeleri pozitif ve negatif iyon modlarında kalibrasyon çözeltisi olarak kullanılabilirler. NaOCCF_3 bileşiği 100-4000 Th aralığında kalibrasyon standardı olarak kullanılmıştır. Hidratlanmış metaller $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_x]^+$ ve tuz kümeleri $[\text{M}(\text{MX})_n]^+$ düşük m/z alanlarında gözlenmişlerdir. Sodyumun; klor, format ve asetat ile oluşturduğu iyon kümelenmeleri de, düşük m/z bölgelerinde gözlenmiştir. Genellikle örnekte saptanan toplam iyon sayısı (TIC, total ion count); akış hızı, sıcaklık ve kapiler voltajı ile artmıştır. NaCl ve KCl ile alakalı tek

yüklü $[\text{Me}(\text{MeCl})_n]^+$ iyonu için $n = 1, 4, 9, 13, 22, 28, 37, 47$ olduğu halde, tam tarama spektrumunda $n=9$ görünmeyen iyon kümesi olmuştur. Çok düşük yoğunluklarda (zor saptanabilen) ve normal koni voltajı değerlerinde $n=14, 15, 24, 32$ saptanabilmiştir. $n=1-35$ aralığında $n = 13$ ve 22 için $[(\text{NaCl})_n\text{Cl}]^-$ iyonu kararlılık göstermiştir. Normal koni voltajı altında iyon kümeleri m/z 4000 değerine kadar ulaşmıştır. Düşük voltajlarda $m/z < 1700$ iyonları baskındır. Çözücü koşulları, konsantrasyon, pH ESI-MS'deki iyonların kümeleşmesini etkileyip toplam iyon sayısını değiştirmiştir. MeOH veya MeCN miktarı değişimi toplam iyon sayısını etkilemiştir. %75 MeCN varlığında negatif modda en iyi iyon derişimine ulaşılmıştır. pH=3 olacak şekilde HCl eklemesi yapıldığında, HCl içeren pozitif yüklü NaCl kümelerinin oluştuğu gözlenmiştir; $(\text{NaCl})_{17}(\text{HCl})_2\text{Na}^+$ ve $(\text{NaCl})_{18}(\text{HCl})\text{Na}^+$. Nötral ortama göre yüksek m/z değerlerine sahip iyonlarda ise azalma olmuştur. Bunun nedeni $(\text{NaCl})_n(\text{HCl})_m\text{Na}^+$ iyonundaki ayrışmama yani kümelenme yapısını koruma olduğu önerilmiştir. Nötral ortamdakine benzer negatif yüklü kümeler pH=3'de de saptanmıştır. pH=11 olacak şekilde NaOH eklemesi yapıldığında, nötral ortamdakinden farklı hem pozitif hem de negatif yüklü iyonlar oluşmuştur. Düşük m/z oranında gözlenen iyonlar, NaCl ve NaOH tuzlarının iyon kümeleri şeklindedir. Ayrıca yüksek m/z oranlarında büyük iyon kümeleri oluşmamıştır. Düşük m/z dolaylarında ise NaCl ve NaOH tuzlarının karışımı halindeki iyon kümelerine rastlanmıştır; $(\text{NaCl})_{3-5}(\text{NaOH})_{1-2}$. Bu iyon kümeleri arasındaki kararlılık farkları, klor ve hidroksil iyonlarının büyüklükleri ile alakalıdır. Anyonik bazı seriler koni voltajı 75V'de Na atomuna karşı test edilmiştir; NaX (X: iyodat I^- , format HCOO^- , asetat CH_3COO^- , nitrit NO_2^- veya nitrat NO_3^-). NaI, m/z 6000 değerine kadar iyon kümeleri oluşumuna neden olmuştur. Bu nedenle kalibrasyonda kullanılabilir. Hem sodyum format hem de sodyum asetat çok benzer iyon kümeleri oluşturmuştur. Format için, $n=31$ ve asetat için $n=32$ değerlerinde en büyük iyon kümeleri meydana gelmiştir. Bazı iyon kümelerinin karışımı da ortamda bulunmuştur. Örneğin; $n=8-14$ aralığında tek format bulunduran $(\text{CH}_3\text{COONa})_n(\text{HCOONa})\text{CH}_3\text{COO}^-$ iyonik yapısı gözlenmiştir. NaCl ve LiCl diğer bütün iyon yapılarından çok farklıdır. LiCl, 167 tanesi pozitif ve 79 tanesi negatif yüklü olmak üzere toplam 246 farklı iyon kümesi meydana getirmiştir. Ayrıca en büyük iyon kümesi $n=152$ değerinde oluşmuştur.

Hao vd (2001)'de yaptıkları çalışmada, 50 mM'lık CaCl_2 çözeltisi pozitif ve negatif iyon modlarında, m/z 0-2500 aralığında taranmıştır. $x=1-3$ olduğu $(\text{CaCl}_2)_n(\text{CaCl})^{xx+}$ pozitif iyon kümeleri gözlenmiştir. Negatif iyon modunda ise, $y=1-3$ olduğu $(\text{CaCl}_2)_n(\text{Cl})^{yy-}$ iyonları gözlenmiştir. Tüm iyon kümeleri m/z oranına göre aydınlatılmaya çalışılıp, MS/MS modu da yapının açıklanmasında kullanılmıştır. CID parçalanması için beş çeşit öncül iyon seçilmiştir; $(\text{CaCl}_2)_3(\text{CaCl})^+$, $(\text{CaCl}_2)_5(\text{CaCl})^+$, $(\text{CaCl}_2)_{10}(\text{CaCl})_{22}^+$ (bir önceki iyonun izobarı), $(\text{CaCl}_2)_{13}(\text{CaCl})_{22}^+$ ve $(\text{CaCl}_2)_{25}(\text{CaCl})_{33}^+$. 50 mM'lık CuCl_2 için MS modundaki yapıların çok daha kompleks olduğu görülmüştür. Saptanan beş çeşit yapı şu şekildedir;



Pozitif modda, CuCl^+ iyonu Cl kaybederek Cu^+ oluşturur. İyon kümeleri özeti ve saptanan n değerleri çizelge 1.3'de görülmektedir.

Çizelge 2.1 Çözeltide oluşan bakır iyonu kümeleri

Mod	İyon Kümesi Formülü	Saptanan n değeri
Pozitif	$(\text{CuCl})_n\text{Cu}^+$	1-6
	$(\text{CuCl})_n(\text{CuCl})^+ /$ $(\text{CuCl}_2)(\text{CuCl})_{n-1}\text{Cu}^+$	1-4
	$(\text{CuCl}_2)_n\text{Cu}^+$	1-17
	$(\text{CuCl}_2)_n(\text{CuCl})^+$	1-17
	$(\text{CuCl}_2)_n(\text{CuCl})\text{Cu}^+$	1-17
Negatif	$(\text{CuCl})_n\text{Cl}^-$	1-3
	$(\text{CuCl}_2)_n\text{Cl}^-$	1-16
	$(\text{CuCl}_2)_n(\text{CuCl})\text{Cl}^-$	1-12
	$(\text{CuCl}_2)_n(\text{CuCl})_2\text{Cl}^-$	1-14

Hem pozitif hem de negatif modlarda CuCl iyon kümelerindeki indirgenmiş Cu, Cu(II) iyonunun indirgenerek Cu(I) meydana getirmesiyle oluşur.

Na_xY molekülü ile yapılan ESI-MS çalışması ($x=1$ veya 2 , $Y = CO_3^{2-}$, HCO_3^- , $H_2PO_4^-$ ve HPO_4^-);

50mM NaCO₃ çözeltisi, CaCl₂ çözeltisinin spektrumuna benzer iyon kümeler spektrumu vermiştir. Pozitif modda +1 ve +2 ve negatif modda -1, -2 ve -3 iyonları açığa çıkmıştır. Çizelge 1.4’de bu iyonlar gösterilmiştir.

Çizelge 2.2 NaCO₃ çözeltisi iyon kümeleri

x veya y	Saptanan n değeri	
	Pozitif iyonlar (Na ₂ CO ₃) _n (Na) _x ^{x+}	Negatif iyonlar (Na ₂ CO ₃) _n (NaCO ₃) _y ^{y-}
1	1-28	1-25
2	15-51	9-43
3	-	19-63

Bikarbonatın karbonata benzer iyonlar vermesi tartışma konusudur. 50mM NaHCO₃’ın pH değeri 8.42 iken 50mM Na₂CO₃’ın pH değeri 11.21 olduğu görülmüştür. Bikarbonat, protonun çıkmasıyla karbonata dönüşmüştür. pH’ın artması karbonat oluşumunu tetiklemiştir. Elektrospreyde bu oluşuma neden olacak bir pH yükselmesi olmuştur. NaH₂PO₄ çözeltisi püskürtüldüğünde, Na₃PO₄ moleküllerinin yanı sıra NaPO₃ molekülleri de ortamda açığa çıkmıştır. NaOH’ın da katıldığı iyon kümeleri hesaba katılınca, pH değerinin elektrosprey sırasında yükseldiği düşünülmüştür. Monosodyum fosfat kullanıldığında, pH değeri ESI’da azalır, disodyum fosfat kullanıldığında ise yükselmiştir. 50 mM NaH₂PO₄ çözeltisi (4.71) asidik özellik gösterirken, 0.05 M Na₂HPO₄ çözeltisi (9.30) bazik özellik göstermiştir. Çözelti buharlaştıkça, pH<7 daha fazla azalmıştır, pH>7 daha fazla artmıştır ve pH=7 için hiçbir değişiklik olmamıştır. Benzer oranlardaki dört farklı fosfat çeşiti (H₃PO₄, H₂PO₄⁻, HPO₄²⁻ ve PO₄³⁻) için pH değişimi düşünüldüğünde; pH<7 iken daha asidik olan formlar baskın olmuştur (0, -1). pH>7 iken alkali formlar ortaya çıkmıştır (2-, 3-). 50 mM’lik monosodyum var iken,

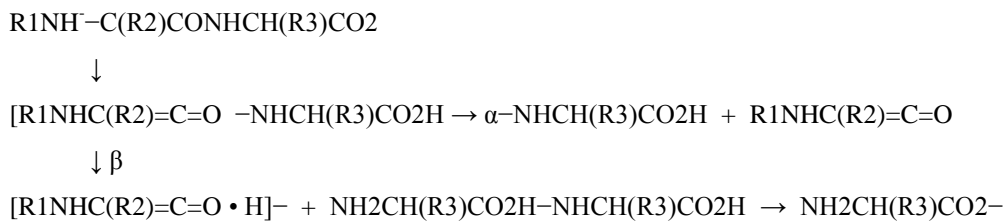
pozitif moddaki 53-31 iyon kümelerini ve negatif moddaki 43-18 iyon kümelerini NaPO_3 , NaH_2PO_4 ve H_3PO_4 molekülleri bastırmıştır.

Chu vd (2001)'de yaptıkları çalışmada, protonlanmış peptitlerin düşük enerjili ($<100\text{eV}$) CID spektrumunda, genellikle a, b ve y tipindeki fragmanlar açığa çıkmıştır. Çözeltideki en bazik kısımlar N-terminaldeki N atomlarıdır ve zincirdeki Arg, Lys ve His aminoasitleridir. Gaz fazında, enerji bariyerleri aşılar ve protonun atomları amit grubunun N atomuna bağlanmasıyla parçalanma başlamıştır. Yüksek N-terminal peptit üzerinde kalırsa b iyonu, C-terminal zincirde kalırsa y iyonu oluşmuştur. b iyonu, tipik olarak nötral CO kaybedip a iyonuna dönüşmüştür. Çözelti halinde Ag(I) iyonunun Met aminoasitine ilgisi olmuştur. Fakat gaz fazında amitteki karbonil grubuyla kompleks yapmıştır ve $[\text{b}_n\text{-H+Ag}]^+$, $[\text{a}_n\text{-H+Ag}]^+$, $[\text{y}_n\text{-H+Ag}]^+$ ve $[\text{b}_n\text{+OH+Ag}]^+$ iyonları oluşmuştur. AAA modelindeki peptit $[\text{b}_2\text{+OH+107Ag}]^+$ iyonunu oluşturmuştur. AA dipeptiti için $[\text{M+107Ag}]^+$ iyonu üründür. Bu iki spektrum oldukça benzerdir. En yoğun pik m/z 196'dir ve iki izobarik iyon bu bölgede gözlenmiştir; $[\text{b}_1\text{+OH+Ag}]^+$ ve $[\text{y}_1\text{-H+Ag}]^+$. Bunun nedeni $[\text{b}_n\text{+OH+Ag}]^+$ ve $[\text{M+Ag}]^+$ ürün iyonlarının benzer kalıntılar içermeleri olduğu öne sürülmüştür.

Sonsmann vd (2002)'de yaptıkları çalışmada, ESI-MS'e maruz bırakılan triptik peptitlerin, pozitif modda, çift protonlanma eğiliminde oldukları görülmüştür. Parçalandıklarında ise genellikle tek yüklü b ve y iyonları vermişlerdir. Triptik peptitlerin parçalanmasında birden fazla bazik aminoasit içeren peptitlerin 4-5 kere protonlanabileceği görülmüştür. Parçalanma bu yüksek yük derecelerinde daha fazladır. Ayrıca ürün iyonlar da yüksek yük derecelerine sahip olmuşlardır. Peptitlerin kimyasal türevleri ile yapılan yüksek yüklü peptit çalışmaları da bu durumu kanıtlamıştır. Hareketli protonun peptit zincirinde rasgele dağılarak parçalanmaya neden olduğu pek çok mekanizma tanımlanmıştır. Mekanizmaların çoğu bir veya iki bazik kalıntı olması koşuluyla sınırlıdır; fakat Coulombic itmenin meydana geleceği çift bazik kalıntının bulunması ihtimali de vardır. Bu durumda hareketli protonun peptit zinciri üzerindeki hareketi sınırlanır; çünkü C-terminal uç negatif yüklerle lokalize olmuştur ve protonla etkileşmeye yönelmiştir. Bu etkileşimin olduğu bölge parçalanma için uygundur. Negatif yüklerin etkisini daha iyi görmek için, Cys bulduran peptit sisteik asite

oksitlenmiştir. Negatif bir yük diğer bir protonla etkileşerek moleküler iyon üzerinde net pozitif yük oluşturmuştur, böylece y iyonları (N-terminal yüklü) baskın hale gelmiştir. Glukagon (HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVWLMNT) ESI-MS/MS ile m/z 250-2000 aralığında çalışılmıştır. MS/MS spektrumunda +2, +3 ve +4 yük dereceleri farklı parçalanma davranışları göstermiştir. +5 iyonunun beş farklı titre edilebilir kısmı olmasına rağmen ortamda gözlenmemiştir. Bunun nedeni Arg-17 ve -18 kalıntılarının çok yakın olması olabilir; bu nedenle sadece biri protonlanabilmiştir. +2 yüklü glukagon iyonu ise çok zayıf bir şekilde parçalanmıştır. İyonların genellikle Asp'nin COOH grubunun parçalanmasıyla meydana geldiği görülmüştür. Bunun nedeni deproton olmuştur karboksil grubuna nükleofilik atak olarak düşünülmüştür. +3 glukagondan gelen ürün iyonu daha çok y ve b iyonları oluşturmuştur. Ayrıca bunlar çift yüklüdürler. Bunun nedeni her iki uçta bulunan hareketli protonlardır. +4 yüklü ürün iyon, daha çok C-terminalden parçalanma yapmıştır. +3 yüklü b iyonları ise protonlanmış bazik kalıntılı (His, Lys, Arg) C-terminal üzerindeki hareketli proton ile etkileşerek bu yapıya dönüşmüştür.

Bowie vd (2002)'de yaptıkları çalışmada MH^+ iyonları için b ve y+2 iyonları gözlenmiştir. Negatif iyon spektrumunda deproton olmuştur peptitler için α ve β ayrılmaları meydana gelmiştir. Pozitif iyon modu negatif moddan biraz daha farklıdır. Önerilen mekanizma;



α ve β parçalanması enolat anyonlarının oluşması ile gerçekleşmiştir. 2. reaksiyon α ürününün yük/proton düzenlenmesini gösterir. Enolat anyonları, deprotonasyon ile ya da peptit tarafından $-COO^-$ 'a ya da $CONH^-$ 'a transfer ile oluşmuştur.

Anbalagan vd (2003)'de yaptıkları çalışmaya göre, N-açillenmiş GGG peptidi (AcGGG), C-terminal ucundan etil, propil ve butil ile esterleşmiştir. Li, Ag ve Na

katyonları ile yapılan çalışmada, AcG kalıntısının çıkışıyla AcGGGOEt molekülü y^{2+} iyonları açığa çıkarmıştır. Me=Li, Na veya Ag olduğu $[y_2-1+Me]^+$ tipindeki iyonlar düşük yoğunluklarda saptanmıştır. Na veya Ag ile katyonize olmuş fragmanlar tekrar parçalanarak $[b_2-1+Me]^+$ ve $[a_2-1+Me]^+$ iyonları meydana getirmişlerdir. Bütün metal bağlı AcGGGOEt iyonları, $[AcGGGOEt-H_2O+Me]^+$ şeklinde, Na, Li ve Ag için en bol iyon olarak ortaya çıkmışlardır.

Charles vd (2003)'de yaptıkları çalışmada, iyon kümeleri pozitif modda $[CA]_x C_m^{m+}$ şeklinde ve negatif modda $[CA]_y A_n^{n-}$ şeklinde ortaya çıkmıştır (tuz için; C: katyon, A: anyonik kısım). Hem yük hem de buharlaşma iyon kümelerinin yük dağılımını etkilemiştir. Tuz kümelerinin yük dağılımını etkileyen faktörler şu şekildedir;

- Tuz derişimi
- Çözeltinin iletkenlik özellikleri
- Viskozite
- Organik çözücünün molar yüzdesi
- Çözücünün polaritesi ve oluşan iyonların karakteristikleri

Harrison vd (2005)'de yaptıkları çalışmada, Pro-Ala ve Pro-Val dipeptitleri Q-ToF ile çalışılmıştır. m/z 113 ve 72 içeren spektrumlar yüksek enerjili CID'de Ala-Pro için, m/z 141 ise Pro-Ala için öngörülmeleyen pikler olarak ortaya çıkmıştır. Pro-Ala için CID 20 eV iken, altı çeşit iyon olduğu saptanmıştır. m/z 141 için a_2 iyonu, m/z 88 için y_1 iyonu, MS3 modunda a_2 iyonundan gelen üç çeşit iyon m/z 47.4, 100 ve 152 değerli iyonlardır. Pro-Val için de altı çeşit iyon saptandı; m/z 169 için a_2 iyonu ve m/z 116 için y_1 iyonu a_2 iyonundan gelen dört farklı iyon; m/z 100, 59.1, 13.9 ve 9.4 değerlerine sahiptir. a_2 iyonundan CO_2 çıkışı ve Pro eliminasyonu ile y_1 iyonu oluşmuştur. Bu reaksiyon bir protonun N-terminalden α -C karboanyon verecek şekilde taşınmasıyla gerçekleşmiştir. Pro-Gly-Gly tripeptidi ve ürünleri olan a_3 ile b_2 iyonlarının spektrumlarına bakıldığı zaman, 20 eV değerindeki parçalanmada beş çeşit ürün olduğu görülmüştür; sırasıyla m/z değerleri; 184, 153, 127, 87 ve 74 olan a_3 , b_2 , a_2 , a_3-p ve y_1 iyonlarıdır. a_3 iyonu tekrar parçalanıp CH_3NH_2 çıkışı ile b_2 ürün iyonunu vermiştir. 57 Da'luk bir kayıp ile a_2 iyonuna dönüşürken bir Pro kalıntısı kaybederek m/z 87'da ana pik oluşturmuştur. PVG peptidinin $[M-H]^-$ ve a_3 iyonlarının CID spektrumu, birincil parçalanmanına a_3 ve

y_1 iyonları oluşturduğunu göstermiştir. a_3 iyonundan da tekrar parçalanma ürün iyonların da ortamda varolduğu görülmüştür. m/z 183'deki pik a_3 iyonunun C_3H_7 kaybetmiş halidir ve nötral CO çıkışı ile m/z 155' de bir pik gözlenmiştir. a_3 iyonunun parçalanması b_2 ve a_2 iyonları verirken ve N-terminal Pro kaybı da m/z 129'de bir pik gözlenmesine neden olmuştur. APG peptitinin ve a_3 ile y_2 ürün iyonlarının spektrumu incelenmiştir. $[M-H]^-$ ana ürünleri a_3 , y_2 ve y_1 iyonları olarak gözlenmiştir. Ala-Pro amit bağındaki kopma ile y_2 iyonu ve C-terminal ucunda taşıdığı yük ile bir H taşıyan bir yan zincir (Gly) veya ara ürün olarak iyon vermeyen alkil yan zinciri meydana getirmiştir. Sinyal m/z 127, Ala kaybederek oluşan a_3 iyonuna veya CO kaybederek oluşan y_2 iyonuna aittir. y_2 iyonunun (deprotone PG) ürün spektrumu PA ve PV'nin m/z 99 değerinde gözlenen ve a_2 (m/z 127) iyonunun etilen kaybederek oluşturduğu $[M-H]^-$ spektrumuna benzer özellik göstermiştir. AAP tripeptidinin a_3 ve b_2 ürünlerinin spektrumu da çalışılmıştır. $[M-H]^-$ ürünleri CO_2 çıkışı ile a_3 ve y_1 (deprotone Pro) meydana getirmiştir. b_2 iyonu nötral pirolidin kaybı ile a_3 iyonu oluşturmuştur. Ayrıca m/z 87 iyonu a_3 iyonundan gelen c_1 iyonudur. CID'de b_2 iyonu aktivasyonu m/z 124, 113, 111 ve 97 piklerinin oluşumunu tetiklemiştir. Bunlar sırasıyla NH_3 , CO, H_2 , C, O, C_2 , H_4 ve O çıkışlarıdır. LAP tripeptiti ve a_3 ile b_2 iyon ürünleri de çalışılmıştır. Tekrar $[M-H]^-$ iyonu a_3 ve y_1 iyonlarının çıkışı ile a_3 iyonundan pirolidin çıkışı ile b_2 iyonunun oluştuğu gözlenmiştir. b_2 iyonunun ileri parçalanmasından NH_3 çıkışı ile m/z 166, CO çıkışı ile m/z 155, $[H_2CO]$ çıkışı ile m/z 153 ve $[C_2H_4O]$ çıkışı ile m/z 139 değerlerinde pikler gözlenmiştir. m/z 166'da gözlenen $[b_2-NH_3]^-$ CO_2 çıkışı ile m/z 122 pikini oluşturmuştur. Tüm b_2 fragmantasyonlarına bakıldığında genel olarak şu yapılar gözlenir;

- N-terminal Pro ile zayıf bir H, b_2 iyonu verir. N-terminalde primer amin var ise b_2 iyonu iki adet zayıf H ile etkileşir.
- b_2 pikinin nötral NH_3 kaybetmesi, b_2 iyonunda serbest amino gruplarının olduğunun göstergesidir.

b_2 iyonundan CO çıkışı önemli bir parçalanma dizisi yaratmıştır; H_2 eliminasyon ile ayrılmıştır. $[b_2-CO]^-$ iyonu ile R_2H çıkışı vardır (R2: tripeptitin 2. amino asidi). Ala-Phe-Pro tripeptitinde, C_7H_8 grubu $[b_2-CO]^-$ iyonundan ayrılıp m/z 97 değerinde ana pik

oluşturmuştur. Benzer olarak Leu-Ala-Pro tripeptitinde CH₄ çıkışı vardır; fakat Leu'dan C₄H₁₀ çıkışı yoktur.

4-kalıntılı Ala-Ala-Pro-Ala peptit ve ürün iyonu y₂ de çalışılmıştır. y₂ iyonu, [M-H]⁻ iyonunun ana parçalanma ürünüdür. 5-kalıntılı Ala-Ala-Pro-Ala-Ala, [M-H]⁻ iyonu ile ESI-MS'de çalışılmıştır. Bu çalışmada y₃ ve [y₃-CO₂]⁻ en belirgin ürünlerdir ve parçalanma Pro tarafında meydana gelmiştir. Prolin etkisi [M+H]⁺ ve [M+nH]ⁿ⁺ (örneğin tek veya çift protone olmuş Pro bulunduran peptit) iyonlarında ortaya çıkmıştır. VGVAPG peptitinde baskın y₂ ve b₄ iyonları birer kanıttır (çünkü b₃, b₄ iyonunun parçalanma ürünüdür). Xxx-Yyy-Pro tripeptitlerindeki [M+H]⁺ iyonu da önemli derecede y₁ iyonu vermiştir. Xxx-Pro-Yyy tripeptitindeki [M+H]⁺ iyon çalışmalarını Pro tarafındaki C-terminalde daha fazla parçalanma olduğunu göstermiştir.

Romanov vd (2008)'de yaptıkları araştırmada, gümüş ile çalışılmıştır. Ag⁺, 46 temel halde elektrona sahiptir (4s²4p⁶4d¹⁰) ve metal transferiyle detoksifikasyonda görev alan metalotiyonine yüksek ilgisi vardır. Gaz fazında peptitlere sıkı bağlanır ve sekans saptanmasında kullanılabilir. Ag⁺, alfa-amino asitlerle mono-, di- ve tri-koordine kompleksleri vermiştir.

Cooper vd (2005)'de yaptıkları çalışmada, AAAG ve A(βA)AG peptitleri Li⁺ iyonu varlığında ESI-MS/MS'de CID modunda iyonlaştırılmıştır. m/z 238 [b₃+17+Li]⁺, 220 [b₃-1+Li]⁺ ve 192 [a₃-1+Li]⁺ iyonlarının en baskın ürünler olduğu görülmüştür. AAAG peptiti için m/z 277 ve 260 değerlerindeki piklerin nötral H₂O (18u) kaybetmesi, hem H₂O hem de NH₃ (35u) çıkışı gözlenirken, βA-içeren peptitlerde bu durum görülmemiştir. [b₃-1+Li]⁺ iyonu AAAG ve A(βA)AG peptitlerinin lityum-katyonize halidir. En belirgin parçalanma yolu [b_n]⁺ ve [b_n-1+Cat]⁺ iyonları için CO eliminasyonu ile [a_n-1+Cat]⁺ iyonunun oluşumudur. m/z 220 [b₃-1+Li]⁺ iyonunun MS3 spektrumuna bakılırsa; hem AAAG hem A(βA)AG peptiti için de en yoğun CO (28u) kaybederek oluşan m/z 192 [a₃-1+Li]⁺ iyonunun olduğu görülmüştür. Ayrıca AAAG peptiti 71u kaybederek m/z 149 iyonu verirken A(βA)AG peptiti 72 u kaybederek m/z 148 iyonu vermiştir. AxAG peptiti için dört farklı x seçilmiştir (β-Ala, γ-amino bütirik asit, ε-amino-n-kaproik asit ve 4-aminometilbenzoik asit). Her durumda [b₃-1+Li]⁺

iyonu daha fazla 71u kaybetme ve daha az 28 u kaybetme (CO) eğilimi göstermiştir. $[b_3-1+Li]^+$ iyon fragmantasyonu çeşitli yollarla olur;

- α -Ala kalıntısının kaybı ile $[b_2-1+Li]^+$ iyonu oluşumu
- nötral CO kaybı ile $[a_2-1+Li]^+$ iyonu oluşumu
- α -lactone çıkışı ile litinli nitril oluşumu
- Li-katyonize 2H-azirine oluşturan CO_2 eliminasyonu

Wells vd (2005)'de yaptıkları çalışmaya göre, protein ve peptitlerin MS yapılandırılmasındaki en yaygın method, inert bir gaz ile çarpışmasını sağlamaktır; çarpışma-indüklü parçalanma (CID, collision-induced dissociation). MS yapılandırması, çarpışmanın yarattığı birincil ve ikincil ürünlerin yani iyon ve komplekslerin aydınlatılmasında çok faydalı olmuştur. Büyük ve çok yüklü iyonların, çarpışma sırasındaki enerji transfer mekanizması, küçük iyonlarınkı kadar anlaşılamamıştır. CID koşullarının bir fonksiyonu olarak protein/peptitlerin parçalanmasına etki eden unsurlar şunlardır;

- Molekül için yapılanmanın süresi
- Aktivasyon sırasında depolanan enerji
- Enerjinin salınımı
- Depolanmış enerjinin değişkenliği
- Depolanmış enerjinin dağılım biçimi (titreşim, elektronik...)
- Cihazın sinyalokuma zaman aralığı

Barlow vd (2005)'de yaptıkları çalışmada, peptit kaynaklı katyonik radikallerin gaz fazında oluşmasıyla ilgili basamaklaraçıklanmaya çalışılmıştır. Buna göre, yardımcı ligand L yardımıyla metalik iyon M ile koordine olmuş nötral peptit P gaz fazına girmiştir. Metalin indirgenmesi ve peptitin yükseltgenerek katyonik radikal ara basamağı ($P+\bullet$) oluşturması sonucu CID homolitik bağ ayrışmasına neden olmuştur. Meydana gelen yapılar kimyasal yapıyla farklılık göstermiştir. Örneğin; $[Cu(II)(dien)-YGGFRLR]^{2+}$ iyonu $YGGFRLR^{+\bullet}$ radikali oluşturmuştur. Cu(II), peptitler ve amino asitler için bir oksidandır. Ayrıca CID'de çalışılan üç değerlikli metallerin peptitler ile daha iyi kompleksler verebileceği belirtilmiştir. $[Cr(III)(salen)YGGFRLR]^+$ moleküler iyonunun CID spektrumuna göre peptitten birçok küçük molekül ayrılmıştır. 18, 35 ve 60

değerlerindeki pikler, sırasıyla H₂O, H₂O+NH₃ ve H₂O+NH=C=NH gibi küçük molekülleri göstermiştir. NH=C=NH molekülü peptitdeki R yan zincirinden gelmiştir. Peptit-metal kompleksi [Cr^{III}(salen)]⁺ az miktarlarda da olsa katyonik radikal P^{+•} vermiştir. [Mn^{III}(salenX)(P)]⁺ kompleksi, [Mn^{III}(salen)]⁺ iyonuna parçalanır ve ikisi de tekrar nötral peptit P ve P^{+•} radikali vermiştir. Ligand salenH₂X'in indirgenip iki protonun ayrılmasıyla da [Mn^{III}(P-2H)]⁺ iyonunu meydana getirmiştir. Meydana gelen atom kayıpları peptitten çok X metalinden kaynaklanmıştır. [Mn^{III}(salenNO₂)YGGFLR]⁺, P^{+•} radikali ve bazı fragman iyonlar oluşması muhtemeldir. Radikal mekanizmasıyla oluşan [Mn^{III}(salenCl)(P)]⁺ oldukça fazla miktarda gözlenmiştir; fakat [Mn^{III}(salenCl)]⁺ ve [Mn^{III}(P-2H)]⁺ oldukça az gözlenmiştir. P ve katyonik radikal P^{+•} arasındaki yarış, X metalinin elektron ilgisine bağlıdır. (NO₂>Cl>H>OMe) gibi grupların olması durumunda yukarıdaki sıraya göre X metalini daha fazla bağlamıştır. Fe(III) komplekslerinde P^{+•} radikali baskın olmuştur. Fe(III) iyonu, Mn(III) iyonuna göre daha fazla homolitik bağ kopmasına neden olmuştur. Mn(III) iyonunun tersine, [Fe^{III}(P-2H)]⁺ iyonu ortamda pek fazla görülmemiştir. Co(III) kompleksi reaksiyonları çok daha farklı olduğu gözlenmiştir. Burada peptitin sekansı daha fazla önem kazanmıştır. [Co^{III}(salenX)YGGFLR]⁺ kompleks iyonundan daha fazla katyonik radikaller oluşmuştur. [Co^{III}(salenX)GGGFLR]⁺ kompleksi CID'de, GGGFLR^{+•} radikalinden daha çok bu radikalın ürünü olabilecek [M-CO₂]^{+•} ve [M-•CO₂H]⁺ radikalleri oluşturmuştur. Özet olarak Mn ve Fe metalleri, Cr ve Co metallere katyonik peptit oluşturma konusunda çok daha iyidir.

Unnithan vd (2007)'de yaptıkları çalışmaya göre, poliprolinin iki çeşit helikal yapısı olduğu belirlenmiştir(ProI ve ProII). ProI, sağ-el yönünde, dönüş başına 3.3 amino asit içerir ve peptit bağlarının cis yapıda olduğu belirlenmiştir. ProII, sol-el yönünde ve dönüş başına 3.0 kalıntı içerir, ayrıca peptit bağlarının trans yapıda olduğu bulunmuştur. Heliks tipinin çözücüye göre değiştiği belirtilmektedir. Düşük protik çözücüler (butanol, propanol) ProI yapısına yönlendirmiştir ve ProII daha çok protik çözeltilerde (su) ortaya çıkmıştır. Poliprolin propanol gaz fazına alındığında, ProI heliks kararlılığını korur ve zincirin farklı uzunluklarında ortaya çıkmıştır. Fakat sulu çözeltiden ESI yöntemi ProII heliks yapı kararlılığını göstermemiştir. Buradan da heliksin bir çözelti içinde daha

kararlı olacağı sonucuna ulaşılmıştır. Diğer bir ilgi çekici nokta, protonlanmış N-terminal uç ile ikinci prolin arasında oluşan hidrojen bağıdır. İç kısımlardaki prolin bu bağı N hidrojenine sahip olmadığından oluşturmamıştır. $(\text{Pro}_2+\text{H})^+$ için moleküler modellemede, en düşük enerjili yapı N-terminal ucu, N atomunda H atomlarına sahip olan ve birinci ile ikinci kalıntılardaki karbonil O atomları ile hidrojen bağı oluşturan yapıdır. Peptitlerde, genellikle y iyonu gözlenir; çünkü parçalanma Pro tarafındaki N-terminal uçta gerçekleşmiştir. Prolinin proton affinitesi ve b tipi iyonun gerginliği y iyonlarının oluşumunu arttırmıştır.

Teesch vd (1992)'de yaptıkları çalışmada tanımladıklarına göre, elektrosprey (ESI) gibi yumuşak iyonlaştırma tekniklerinin keşfinden bu yana, metal kompleksleri oluşturma biyoaktif moleküllerin karakterizasyonunu genişletmek amacıyla bir analitik araç olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Choi vd (2009)'da yaptıkları çalışmaya göre, geçiş elementleri katyonları çözeltide peptitlere iyi bağlanmışlardır; N-terminal uca sabitlenme önce amitten proton ayrılması sonra metal ile şelatlanmasıyla oluşmuştur. Sung-Seen Choi, bazik ortamda serin (S), treonin (T), asparajin (N), glutamin (Q) polar aminoasitlerinin, $[\text{nPep}-\text{nH}+(\text{n}+1)\text{Na}]^+$ türlerini oluşturduğunu keşfetmiştir.

Kebarle vd (2005) tarihli çalışmasına göre; Na tuzları (NaAc) parçalanma enerjisi arttıkça NaAc'dan NaH'a dönüşürler. Na^+ iyonları asidik kısımları nötralize etmiştir.

Polce vd (2006)'da çeşitli peptitler üzerinde yaptığı çalışmaya göre, bir peptite bağlanan 2 adet lityumdan biri asidik H ile yer değiştirirken diğeri ise zincir boyunca hareketli kalarak parçalanmayı önler ve yükü sağlamıştır ($[\text{Pep}-\text{H}+2\text{Li}]^+$). Çift proton bağlı peptitlerde bir proton bazik Lys ya da Arg C-terminaline bağlanırken, diğer proton zincir boyunca hareket etmiştir. Metal kompleksleri oluşturarak fragmantasyon daha kolay hale gelmiştir. Metaller, bazik kısımlara (karbonil grup, N-terminal, yan zincir) güçlü tutunmuştur. Aynı proton katılmasında olduğu gibi metal katılması da amit karbonunun elektrofilik özelliğini arttırmıştır. Bu da amit bağı parçalanmasına yol açmıştır. 1 mg/mL LiOH ve 20 mg/mL peptit kullanılmıştır (1:20 oranı).

Gross vd (1998)'de yaptıkları çalışmaya göre; aspartat (D), glutamat (E) ve arginin (N) kalıntıları, Ca bağlayan proteinlerde Ca-bağlama noktalarıdır. Genellikle 1, 3, 5, 7 ve 12 pozisyonlarındaki karbonil, karboksil ve aromatik olmayan yan zincirler etkilenir. Yapılan çalışmada $[\text{Pep-H+Ca}]^+$ ve $[\text{Pep+Ca}]^+$ türlerine rastlanmıştır. Çözücünün affiniteye etki ettiğini bulmuşlardır. Peptit zincirindeki asidik kalıntı sayısı arttıkça, Ca-bağlı iyon türler protonlanmış türlere göre artmıştır. Ca, Co ve Fe katyonları için, metal N-terminale yakınsa y ve z; C-terminale yakınsa b ve c parçalanma iyon türlerinin oluşacağı ileri sürülmüştür. DANADG, DRADNA, DDRANV peptitleri y_5 iyonu vermezken DENADG vermiştir. Bu Ca'nın DE'ye bağlandığını göstermiştir.

Crizer vd (2009)'da yaptıkları çalışmada, 3 adet deprotonasyona uğrayan DGAILDGAILD peptiti ile Co, Cu ve Fe çift yüklü katyonları arasında oluşan komplekslere odaklanmıştır. Fenantrolin çift dişli ligandı yardımıyla metaller çözeltiye eklenmiştir. Reaksiyon mekanizması için önerilen metabolik yol, $1e^-$ negatif yükün geçiş metali kompleksine aktarılması şeklindedir. Böylece ligand tarafından serbest bırakılan metal peptite bağlanır. Ayrıca Cu katyonu, Co ve Fe katyonlarına göre daha fazla e^- aktarımına yatkın olduğu için daha fazla kompleks oluşturmaya meyillidir. David ve ekibi $[\text{Pep-3H+X}]^-$ yapısını gözlemişlerdir.

Smith vd (2000)'de yaptığı çalışmaya göre, Arg kalıntısı dışında bir kalıntıya bağlanan H^+ , hareketli protonudur. Yani ana zincir ya da yan zincir boyunca taşınarak parçalanmaya neden olan reaksiyonlara engel teşkil ederler. Eğer peptitte Arg, His ya da Lys gibi fonksiyonel kalıntılar varsa, bu kalıntılara yakın bağlar uygun şartlar altında parçalanır denmiştir.

Biz çalışmamızda, peptitlerin çeşitli metal çözeltilerini elektrosprey iyonizasyonu ile kütle spektrometresinde iyonlaştırarak oluşan iyonları inceledik. Bunun için 3 adet peptiti 9 çeşit metal ile formik asit ve asetonitril içeren çözeltide karıştırdık. Bu çalışmadaki amaç, peptitlerin parçalanmasında metallerin belli bir mekanizmaya yol açıp açmadığını anlamaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Materyaller

Projede kullanılan kütle spektrometresi: Waters/Micromass QToF micro

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Projede kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.1'deki gibidir.

Çizelge 3.1 Projede kullanılan kimyasallar

Kimyasal Maddeler		Firma Adı
Kasyonlar	Sodyum asetat Potasyum nitrat Lityum asetat Bakır nitrat Kalsiyum asetat Magnezyum asetat Kobalt asetat Demir asetat	Sigma Aldrich
Peptitler	NPY VPR Betanova	Sigma Aldrich
(Glu 1)-Fibrinopeptit B		Sigma Aldrich
Formik Asit		Fluka
Döteryum Oksit		Merck
Asetonitril		Fluka

D: Aspartat, negatif yüklü grup

E: Glutamat, negatif yüklü grup

K: Lizin, pozitif yüklü grup

R: Arginin, pozitif yüklü grup

H: Histidin, pozitif yüklü grup

Yukarıda verilen aminoasitler, peptitlerin yük kazanmasına neden olan kalıntılardır. Bir peptitin sahip olduğu aminoasit dizisindeki pozitif veya negatif yüklü aminoasit sayıları o peptitin çözelti ortamında kazanacağı toplam yüke etki eder.

Çizelge 3.2 Kullanılan peptitlerin kimyasal özellikleri

Ad	Aa	Moleküler ağırlık		Sekans	Yapısal özellik
		Ortalama	Monoizotopik		
NPY	24	2983.38	2981.5624	PAEDLARYYSA LRHYINLITRQR Y	α -helix
Betanova	20	2253.42	2252.1046	RGWSVQNGKY TNNKTTTEGR	Multi-turn β -sheet
Vpr(13-33)	21	2585.85	2584.2809	EPYNEWTLELL EELKSEAVRH	α -helix

[Glu1]-Fibrinopeptide-B, EGVNDNEEGFFSAR sekansındadır ve ortalama kütlesi 1570.57 (g/mol) ve monoizotopik kütlesi 1569.6696 Th'dır. Kütle spektrometresinde kalibrasyon amaçlı kullanılır. İyonik amino asitler olarak Glu ve Asp, ayrıca C-terminal ucunda da Arg vardır. Sulu çözeltide 5 anyonik, 2 katyonik yük taşır ve net yükü -3'dür. +1 ve +2 yüklü kompleks oluşturma potansiyeline sahiptir. DNEE amino asit sekansı Glu-Fib peptitinin bir katyon çevresinde koordinasyon kurmasına olanak sağlar. Pozitif iyon modunda ve asidik ortamda en fazla +2 pozitif yük taşıyabilir. Negatif modda ve güçlü bazik ortamda ise en fazla -5 negatif yük taşıyabilir (çizelge 2.4).

Çizelge 3.3 Glu-Fib peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapıları ve monoizotopik kütleleri

Yük	İyon	Monoizotopik kütle
1+	$[M+H]^+$	1570.6774
2+	$[M+2H]^{2+}$	785.8426

Formik asit ve asetik asit çözeltisinde ESI ile çalışıldığında Glu-Fib kolayca $[M + 2H]^{2+}$ iyonu oluşturur. Fizyolojik ortamdaki sekonder yapısı bilinmemektedir. Bu çalışmada sadece kontrol ve kalibrasyon amacıyla kullanılmıştır.

Neuropeptide Y (NPY) (13-36), (PAEDLARYYSALRHYINLITRQRY), 24 adet aminoasit dizisinden oluşur. 4 adet Arg içerir ve hiç Lys kalıntısı yoktur. 1 adet Glu 1 adet de Asp kalıntısı vardır. Sulu çözeltide +3 yük taşır. Bu durum metallere bağlanmasını etkileyebilir. ED sekansı içerdiğinden $z=+1$ ya da +2 olan metallere bağlanabilir. Pozitif modda ve asidik ortamda +5 yüklüdür. Çizelge 2.5’de NPY peptitinin elektrospreyde aminoasit kopması ve proton bağlanması sonucu oluşturacağı +1, +2 ve +3 yüklü iyonlarının kütleleri verilmiştir. Bu iyonlar Biemann iyonları olarak adlandırılmaktadır.

Çizelge 3.4 NPY peptitinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve monoizotopik kütleleri

Yük	İyon	Monoizotopik kütle
1+	$[M+H]^+$	2982.5702
2+	$[M+2H]^{2+}$	1491.7890
3+	$[M+3H]^{3+}$	994.8620
4+	$[M+4H]^{4+}$	746.3984
5+	$[M+5H]^{5+}$	597.3203

Çizelge 3.5 NPY peptiti için Biemann iyonları listesi

z= +1, +2, +3 değerleri için protonlanmış b ve y Biemann iyonları								
Sekans	#	b iyonları			y iyonları			#
		+1	+2	+3	+1	+2	+3	
P	1	98.1	49.5	33.4	2982.6	1491.8	994.9	24
A	2	169.1	85.1	57.0	2885.5	1443.3	962.5	23
E	3	298.1	149.6	100.1	2814.5	1407.7	938.8	22
D	4	413.2	207.1	138.4	2685.4	1343.2	895.8	21
L	5	526.3	263.6	176.1	2570.4	1285.7	857.5	20
A	6	597.3	299.1	199.8	2457.3	1229.2	819.8	19
R	7	753.4	377.2	251.8	2386.3	1193.6	796.1	18
Y	8	916.5	458.7	306.2	2230.2	1115.6	744.1	17
Y	9	1079.5	540.3	360.5	2067.1	1034.1	689.7	16
S	10	1166.5	583.8	389.5	1904.1	952.5	635.4	15
A	11	1237.6	619.3	413.2	1817.0	909.0	606.3	14
L	12	1350.7	675.8	450.9	1746.0	873.5	582.7	13
R	13	1506.8	753.9	502.9	1632.9	817.0	545.0	12
H	14	1643.8	822.4	548.6	1476.8	738.9	492.9	11
Y	15	1806.9	904.0	603.3	1339.7	670.4	447.3	10
I	16	1920.0	960.5	640.7	1176.7	588.8	392.9	9
N	17	2034.0	1017.5	678.7	1063.6	532.3	355.2	8
L	18	2147.1	1074.1	716.4	949.6	475.3	317.2	7
I	19	2260.2	1130.6	754.1	836.5	418.7	279.5	6
T	20	2361.2	1181.1	787.8	723.4	362.2	241.8	5
R	21	2517.3	1259.2	839.8	622.3	311.7	208.1	4
Q	22	2645.4	1323.2	882.5	466.2	233.6	156.1	3
R	23	2801.5	1401.3	934.5	338.2	169.6	113.4	2
Y	24	2964.6	1482.8	988.9	182.1	91.5	61.4	1

Eğer NPY hafif asidik veya alkali olmayan sulu çözücüyeye alınırsa, tüm iyonik yan grupları ve N- ile C-terminal uçları iyonikleşerek +3 net yük taşır. Çözücüden 3 proton alır ve monoizotopik kütlesi m/z 994.8620 değerinde olan $[M+3H]^{3+}$ iyonu oluşur. Ortam asidik ise fazladan bir veya iki proton bağlanarak $[M+4H]^{4+}$ veya $[M+5H]^{5+}$ iyonları oluşur. Protonlanmış NPY iyonik yapıları çizelge 3.6'da görülmektedir. Bu türlerin m/z kütleleri, monoizotopik kütlelerin yüke bölünmesi ile elde edilir. Bu birimsiz değer, tamamen kütle spektrometresine yöneliktir ve kütle spektrometresinin analiz sonuçlarının bağıl yoğunluğa karşı ifade edilmesinde kullanılır. Spektrum olarak adlandırılan bu veri çıktısı bağıl yoğunluğa karşı m/z değerlerinin grafiklendirilmesi şeklindedir. Çizelge 3.6'de ise protonlanmış yapılara ek olarak metallenmiş NPY peptit iyonları ve m/z kütleleri monoizotopik kütlelerinin m/z değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.6 NPY peptitinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri

	Yük Durumu	m/z	Kütle
NPY(13-36)	+1	$[M+H]^+ = (M+H)/1$	2982.5702
	+2	$[M+2H]^{2+} = (M+2H)/2$	1491.789
	+3	$[M+3H]^{3+} = (M+3H)/3$	994.8619
2981.562415	+4	$[M+4H]^{4+} = (M+4H)/4$	746.3984
	+5	$[M+5H]^{5+} = (M+5H)/5$	597.3203
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Na]^+ = (M+H)/1$	3004.5522
	+2	$[M+2Na]^{2+} = (M+2H)/2$	1513.7710
2981.5624	+3	$[M+3Na]^{3+} = (M+3H)/3$	1016.8439
	+4	$[M+4Na]^{4+} = (M+4H)/4$	786.3804
	+5	$[M+5Na]^{5+} = (M+5H)/5$	619.3023
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+K]^+ = (M+K)/1$	3020.5261
	+2	$[M+2K]^{2+} = (M+2K)/2$	1529.7449
2981.5624	+3	$[M+3K]^{3+} = (M+3K)/3$	1032.8178
	+4	$[M+4K]^{4+} = (M+4K)/4$	784.3543
	+5	$[M+5K]^{5+} = (M+5K)/5$	635.2762
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Li]^+ = (M+Li)/1$	2988.578405
	+2	$[M+2Li]^{2+} = (M+2Li)/2$	1497.797205
2981.5624	+3	$[M+3Li]^{3+} = (M+3Li)/3$	1000.87013833
	+4	$[M+4Li]^{4+} = (M+4Li)/4$	752.406605
	+5	$[M+5Li]^{5+} = (M+5Li)/5$	603.328485
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Cu]^{2+} = (M+Cu)/2$	1522.2459995
	+4	$[M+2Cu]^{4+} = (M+2Cu)/4$	776.8553995

Çizelge 3.6 NPY peptitinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri (devam)

2981.5624	+6	$[M+3Cu] 6+ = (M+3Cu)/6$	528.3918661
	+8	$[M+4Cu] 8+ = (M+4Cu)/8$	404.1600995
	+10	$[M+5Cu] 10+ = (M+5Cu)/10$	329.6210395
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Ca] 2+ = (M+Ca)/2$	1510.7624955
	+4	$[M+2Ca] 4+ = (M+2Ca)/4$	765.3718955
2981.5624	+6	$[M+3Ca] 6+ = (M+3Ca)/6$	516.90836216
	+8	$[M+4Ca] 8+ = (M+4Ca)/8$	392.6765955
	+10	$[M+5Ca] 10+ = (M+5Ca)/10$	318.1375355
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Mg] 2+ = (M+Mg)/2$	1502.7737225
	+4	$[M+2Mg] 4+ = (M+2Mg)/4$	757.3831225
2981.5624	+6	$[M+3Mg] 6+ = (M+3Mg)/6$	508.91958916
	+8	$[M+4Mg] 8+ = (M+4Mg)/8$	384.6878225
	+10	$[M+5Mg] 10+ = (M+5Mg)/10$	310.1487625
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Co] 2+ = (M+Co)/2$	1520.247799
	+4	$[M+2Co] 4+ = (M+2Co)/4$	774.857199
2981.5624	+6	$[M+3Co] 6+ = (M+3Co)/6$	526.3936656
	+8	$[M+4Co] 8+ = (M+4Co)/8$	402.161899
	+10	$[M+5Co] 10+ = (M+5Co)/10$	327.622839
NPY(13-36)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Fe] 2+ = (M+Fe)/2$	1518.7486695
	+4	$[M+2Fe] 4+ = (M+2Fe)/4$	773.3580695
2981.5624	+6	$[M+3Fe] 6+ = (M+3Fe)/6$	524.894536166
	+8	$[M+4Fe] 8+ = (M+4Fe)/8$	400.6627695
	+10	$[M+5Fe] 10+ = (M+5Fe)/10$	326.1237095

Vpr(13-33), (EPYNEWTLELLEELKSEAVR), 21 adet aminoasit dizisinden oluşur. 6 adet Glu içerir. Asp kalıntısı yoktur. C-terminal ucunda 7 adet negatif yük taşıma potansiyeli vardır. 1 adet Lys ve 1 adet Arg taşır ve bu gruplar +3 yüklenme potansiyelindedir. Pro kalıntısı ikinci kalıntıdır ve peptitin orta kısmında olmadığından heliks- veya sheet- yapısını bozmaz. Sulu çözeltide net yük $z=-4$ olacaktır, böylece katyonik metallere kolayca bağlanabildiği düşünülmüştür. Glu peptit zinciri boyunca yayılmıştır. Çizelge 3.8' de Vpr peptiti için elektrospreyde oluşan Biemann iyonları ve monoizotopik kütlelerinin m/z değerleri verilmiştir. Çizelge 3.9'da protonlanmış Vpr iyonları ve çizelge 3.10'da metallenmiş Vpr iyonlarının monoizotopik kütlelerinin m/z değerleri verilmiştir

Çizelge 3.7 Vpr peptiti için Biemann iyonları listesi

z= +1, +2, +3 değerleri için protonlanmış b ve y Biemann iyonları								
Sekans	#	b iyonları			y iyonları			#
		+1	+2	+3	+1	+2	+3	
E	1	130.1	65.5	44.0	2585.3	1293.1	862.4	21
P	2	227.1	114.1	76.4	2456.2	1228.6	819.4	20
Y	3	390.2	195.6	130.7	2359.2	1180.1	787.1	19
N	4	504.2	252.6	168.7	2196.1	1098.6	732.7	18
E	5	633.3	317.1	211.8	2082.1	1041.5	694.7	17
W	6	819.3	410.2	273.8	1953.0	977.0	651.7	16
T	7	920.4	460.7	307.5	1767.0	884.0	589.7	15
L	8	1033.5	517.2	345.2	1665.9	833.5	556.0	14
E	9	1162.5	581.8	388.2	1552.8	776.9	518.3	13
L	10	1275.6	638.3	425.9	1423.8	712.4	475.3	12
L	11	1388.7	694.8	463.6	1310.7	655.9	437.6	11
E	12	1517.7	759.4	506.6	1197.6	599.3	399.9	10
E	13	1646.8	823.9	549.6	1068.6	534.8	356.9	9
L	14	1759.8	880.4	587.3	939.5	470.3	313.9	8
K	15	1887.9	944.5	630.0	826.5	413.7	276.2	7
S	16	1975.0	988.0	659.0	698.4	349.7	233.5	6
E	17	2104.0	1052.5	702.0	611.3	306.2	204.4	5
A	18	2175.0	1088.0	725.7	482.3	241.6	161.4	4
V	19	2274.1	1137.6	758.7	411.2	206.1	137.8	3
R	20	2430.2	1215.6	810.7	312.2	156.6	104.7	2
H	21	2567.3	1284.1	856.4	156.1	78.5	52.7	1

Çizelge 3.8 Vpr peptidinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve monoizotopik kütleleri

Yük	İyon	Monoizotopik kütle
1+	$[M+H]^+$	2585.2888
2+	$[M+2H]^{2+}$	1293.1483
3+	$[M+3H]^{3+}$	862.4348

Çizelge 3.9 Vpr peptidinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri

	Yük Durumu	m/z	Kütle
Vpr(13-33)	+1	$[M+H]^+ = (M+H)/1$	2585.288741
	+2	$[M+2H]^{2+} = (M+2H)/2$	1293.148271
	+3	$[M+3H]^{3+} = (M+3H)/3$	862.4347803
2584.280941	+4	$[M+4H]^{4+} = (M+4H)/4$	647.0780353
	+5	$[M+5H]^{5+} = (M+5H)/5$	517.8639882
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Na]^+ = (M+H)/1$	2607.270711
	+2	$[M+2Na]^{2+} = (M+2H)/2$	1315.1302405
2584.280941	+3	$[M+3Na]^{3+} = (M+3H)/3$	884.416750333
	+4	$[M+4Na]^{4+} = (M+4H)/4$	669.06000525
	+5	$[M+5Na]^{5+} = (M+5H)/5$	539.8459582
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+K]^+ = (M+K)/1$	2623.244649
	+2	$[M+2K]^{2+} = (M+2K)/2$	1331.1041785
2584.280941	+3	$[M+3K]^{3+} = (M+3K)/3$	900.39068833
	+4	$[M+4K]^{4+} = (M+4K)/4$	685.03394325
	+5	$[M+5K]^{5+} = (M+5K)/5$	555.8198962
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Li]^+ = (M+Li)/1$	2591.296946
	+2	$[M+2Li]^{2+} = (M+2Li)/2$	1299.1564755
2584.280941	+3	$[M+3Li]^{3+} = (M+3Li)/3$	868.44298533
	+4	$[M+4Li]^{4+} = (M+4Li)/4$	653.08624025
	+5	$[M+5Li]^{5+} = (M+5Li)/5$	523.8721932
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Cu]^+ = (M+Cu)/1$	1323.60527
	+2	$[M+2Cu]^{2+} = (M+2Cu)/2$	677.53503475
2584.280941	+3	$[M+3Cu]^{3+} = (M+3Cu)/3$	462.17828966
	+4	$[M+4Cu]^{4+} = (M+4Cu)/4$	354.499917125
	+5	$[M+5Cu]^{5+} = (M+5Cu)/5$	289.8928936
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Ca]^{2+} = (M+Ca)/2$	1312.121766
	+4	$[M+2Ca]^{4+} = (M+2Ca)/4$	666.05153075
2584.280941	+6	$[M+3Ca]^{6+} = (M+3Ca)/6$	450.69478566
	+8	$[M+4Ca]^{8+} = (M+4Ca)/8$	343.016413125

Çizelge 3.9 Vpr peptidinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri (devam)

	+10	$[M+5Ca] 10+ = (M+5Ca)/10$	278.4093896
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Mg] 2+ = (M+Mg)/2$	1304.132993
	+4	$[M+2Mg] 4+ = (M+2Mg)/4$	658.06275775
2584.280941	+6	$[M+3Mg] 6+ = (M+3Mg)/6$	442.70601266
	+8	$[M+4Mg] 8+ = (M+4Mg)/8$	335.027640125
	+10	$[M+5Mg] 10+ = (M+5Mg)/10$	270.4206166
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Co] 2+ = (M+Co)/2$	1321.6070695
	+4	$[M+2Co] 4+ = (M+2Co)/4$	675.53683425
2584.280941	+6	$[M+3Co] 6+ = (M+3Co)/6$	460.18008916
	+8	$[M+4Co] 8+ = (M+4Co)/8$	352.501716625
	+10	$[M+5Co] 10+ = (M+5Co)/10$	287.8946931
Vpr(13-33)	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Fe] 2+ = (M+Fe)/2$	1320.10794
	+4	$[M+2Fe] 4+ = (M+2Fe)/4$	674.03770475
2584.280941	+6	$[M+3Fe] 6+ = (M+3Fe)/6$	458.68095966
	+8	$[M+4Fe] 8+ = (M+4Fe)/8$	351.002587125
	+10	$[M+5Fe] 10+ = (M+5Fe)/10$	286.3955636

Betanovapeptiti (RGWSVQNGKYTNNGKTTEGR), 20 adet aminoasit dizisinden oluşmaktadır. 2 adet Arg, 2 adet Lys ve 1 adet Glu kalıntısı vardır. Asp kalıntısı yoktur. Sulu çözeltide $z=+3$ yüklüdür. Pozitif modda ve asidik ortamda tamamen protonlandığında en fazla +5 yüklüdür. Çizelge 3.11’de Betanova peptidinin Biemann iyonlarının, çizelge 3.11’de protonlanmış peptit iyonlarının ve çizelge 3.12’de metallenmiş peptit iyonlarının monoizotopik kütlelerinin hesaplanan m/z değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.10 Betanova peptidinin tahmin edilen protonlanmış yapılar ve monoizotopik kütleleri

Yük	İyon	Monoizotopik kütle
1+	$[M+H]^+$	2253.1125
2+	$[M+2H]^{2+}$	1127.0601
3+	$[M+3H]^{3+}$	751.7094
4+	$[M+4H]^{4+}$	564.0340
5+	$[M+5H]^{5+}$	451.4288

Çizelge 3.11 Betanova peptiti için Biemann iyonları listesi

z= +1, +2, +3 değerleri için protonlanmış b ve y Biemann iyonları								
Sekans	#	b iyonları			y iyonları			#
		+1	+2	+3	+1	+2	+3	
R	1	157.1	79.1	53.0	2253.1	1127.1	751.7	20
G	2	214.1	107.6	72.0	2097.0	1049.0	699.7	19
W	3	400.2	200.6	134.1	2040.0	1020.5	680.7	18
S	4	487.2	244.1	163.1	1853.9	927.5	618.6	17
V	5	586.3	293.7	196.1	1766.9	883.9	589.6	16
Q	6	714.4	357.7	238.8	1667.8	834.4	556.6	15
N	7	828.4	414.7	276.8	1539.8	770.4	513.9	14
G	8	885.4	443.2	295.8	1425.7	713.4	475.9	13
K	9	1013.5	507.3	338.5	1368.7	684.8	456.9	12
Y	10	1176.6	588.8	392.9	1240.6	620.8	414.2	11
T	11	1277.6	639.3	426.6	1077.5	539.3	359.8	10
N	12	1391.7	696.3	464.6	976.5	488.7	326.2	9
N	13	1505.7	753.4	502.6	862.4	431.7	288.2	8
G	14	1562.7	781.9	521.6	748.4	374.7	250.1	7
K	15	1690.8	845.9	564.3	691.4	346.2	231.1	6
T	16	1791.9	896.4	598.0	563.3	282.1	188.4	5
T	17	1892.9	947.0	631.7	462.2	231.6	154.7	4
E	18	2022.0	1011.5	674.7	361.2	181.1	121.1	3
G	19	2079.0	1040.0	693.7	232.1	116.6	78.1	2
R	20	2235.1	1118.1	745.7	175.1	88.1	59.0	1

Çizelge 3.12 Betanova peptidinin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri

Betanova	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+H]^+ = (M+H)/1$	2253.112447
2252.104647	+2	$[M+2H]^+ 2+ = (M+2H)/2$	1127.060124
	+3	$[M+3H]^+ 3+ = (M+3H)/3$	751.709349
	+4	$[M+4H]^+ 4+ = (M+4H)/4$	564.0339618
2252.104647	+5	$[M+5H]^+ 5+ = (M+5H)/5$	451.4287294
	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Na]^+ = (M+H)/1$	2275.094417
	+2	$[M+2Na]^+ 2+ = (M+2H)/2$	1149.0420935
2252.104647	+3	$[M+3Na]^+ 3+ = (M+3H)/3$	773.691319
	+4	$[M+4Na]^+ 4+ = (M+4H)/4$	586.01593175
	+5	$[M+5Na]^+ 5+ = (M+5H)/5$	473.4106994
	+5	$[M+5NH_4]^+ 5+ = (M+5NH_4)/5$	468.4553034
Betanova	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+K]^+ = (M+K)/1$	2291.068355
	+2	$[M+2K]^+ 2+ = (M+2K)/2$	1165.0160315
2252.104647	+3	$[M+3K]^+ 3+ = (M+3K)/3$	789.665257
	+4	$[M+4K]^+ 4+ = (M+4K)/4$	601.98986975
	+5	$[M+5K]^+ 5+ = (M+5K)/5$	489.3846374
Betanova	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+1	$[M+Li]^+ = (M+Li)/1$	2259.120652
2252.104647	+2	$[M+2Li]^+ 2+ = (M+2Li)/2$	1133.0683285
	+3	$[M+3Li]^+ 3+ = (M+3Li)/3$	757.717554
	+4	$[M+4Li]^+ 4+ = (M+4Li)/4$	570.04216675
	+5	$[M+5Li]^+ 5+ = (M+5Li)/5$	457.4369344
	Yük Durumu	m/z	Kütle
Betanova	+2	$[M+Cu]^+ 2+ = (M+K)/2$	1157.517123
	+4	$[M+2Cu]^+ 4+ = (M+2K)/4$	594.49096125
2252.104647	+6	$[M+3Cu]^+ 6+ = (M+3K)/6$	406.815574
	+8	$[M+4Cu]^+ 8+ = (M+4K)/8$	312.977880375
	+10	$[M+5Cu]^+ 10+ = (M+5K)/10$	256.6752642
Betanova	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Ca]^+ 2+ = (M+Ca)/2$	1146.033619
2252.104647	+4	$[M+2Ca]^+ 4+ = (M+2Ca)/4$	583.00745725
	+6	$[M+3Ca]^+ 6+ = (M+3Ca)/6$	395.33207
	+8	$[M+4Ca]^+ 8+ = (M+4Ca)/8$	301.49437637
	+10	$[M+5Ca]^+ 10+ = (M+5Ca)/10$	245.1917602
Betanova	Yük Durumu	m/z	Kütle
	+2	$[M+Mg]^+ 2+ = (M+Mg)/2$	1138.044846
2252.104647	+4	$[M+2Mg]^+ 4+ = (M+2Mg)/4$	575.01868425
	+6	$[M+3Mg]^+ 6+ = (M+3Mg)/6$	387.343297
	+8	$[M+4Mg]^+ 8+ = (M+4Mg)/8$	293.505603375
2252.104647	+10	$[M+5Mg]^+ 10+ = (M+5Mg)/10$	237.2029872

Çizelge 3.12 Betanova peptininin tahmin edilen metallenmiş yapılar ve monoizotopik kütleleri (devam)

	Yük Durumu	m/z	Kütle
Betanova	+2	$[M+Co] 2+ = (M+Co)/2$	1155.5189225
	+4	$[M+2Co] 4+ = (M+2Co)/4$	592.49276075
2252.104647	+6	$[M+3Co] 6+ = (M+3Co)/6$	404.8173735
	+8	$[M+4Co] 8+ = (M+4Co)/8$	310.979679875
	+10	$[M+5Co] 10+ = (M+5Co)/10$	254.6770637
	Yük Durumu	m/z	Kütle
Betanova	+2	$[M+Fe] 2+ = (M+Fe)/2$	1154.019793
	+4	$[M+2Fe] 4+ = (M+2Fe)/4$	590.99363125
2252.104647	+6	$[M+3Fe] 6+ = (M+3Fe)/6$	403.318244
	+8	$[M+4Fe] 8+ = (M+4Fe)/8$	309.480550375
	+10	$[M+5Fe] 10+ = (M+5Fe)/10$	253.1779342

m/z değerlerini hesaplamakta ki amaç, elde edilen spektrumlardaki değerlere bakılarak iyonların yapıları hakkında tahminde bulunabilmektir.

Kullanılan metallerin izotopik yapıları da çok çeşitlidir. Fakat peptit iyonlarının m/z değerleri hesaplanırken yüksek bolluktaki izotoplar hesaba alınmıştır; çünkü metal atomlarının izotopik bollukları arasındaki fark büyüktür.

Sodyum: Sadece bir tane stabil izotopu vardır; ^{23}Na (22.989769 u).

Amonyu: Bu çalışmada metal olmayan tek yapıdır. İzotopik kütleleri H ve N atomlarına dayanarak hesaplanır. Azotun iki tane izotopu vardır; ^{14}N ve ^{15}N . Hafif olan izotop %99.6 civarındadır ve 14.00307u kütleyle sahiptir. Hidrojen %99.99 bolluğunda 1H atomudur ve kütlesi 1.007825u'dur. Böylece amonyumun izotopu 18.03437u olur.

Potasyum: İki adet izotopu vardır.

Çizelge 3.13 Potasyum atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
^{107}K	38.96370668	0.932581
^{109}K	40.96182576	0.067302

Lityum: İki izotopu arasındaki bolluk farkı fazla olduğundan spektrumlarda pek fazla karışıklığa neden olmaz.

Çizelge 3.14 Lityum atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
6Li	6.015122795	0.0759
7Li	7.01600455	0.9241

Bakır: İki adet stabil izotopu vardır. Hafif olan diğerinin iki katı bolluğa sahiptir. Spektrumları biraz etkileme şansı vardır.

Çizelge 3.15 Bakır atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
63Cu	62.9295975	0.6915
65Cu	64.9277895	0.3085

Kalsiyum: Bu metalin 24 adet izotopu (^{34}Ca 'dan ^{57}Ca 'ya kadar) vardır ve tabloda görülen beş tanesi stabildir. ^{40}Ca izotopu diğerlerine göre çok daha fazla miktarda olduğundan spektrumlarda fazla bir karışıklık gözlenmez.

Çizelge 3.16 Kalsiyum atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
40Ca	39.96259098	0.96941
42Ca	41.95861801	0.00647
44Ca	43.9554818	0.02086
46Ca	45.9536926	0.00004
58Ca	47.952534	0.00187

Kobalt: Bir adet stabil izotopu vardır. 58.9331950 u kütleli ^{59}Co .

Demir: Üç adet stabil izotopu vardır. Fakat ^{54}Fe izotopunun yarı ömrü uzundur bu nedenle stabil olduğu düşünülebilir.

Çizelge 3.17 Demir atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
^{54}Fe	53.9396105	0.05845
^{56}Fe	55.9349375	0.91754
^{57}Fe	56.9353940	0.02119
^{58}Fe	57.9332756	0.00282

Magnezyum: Üç adet izotopu vardır.

Çizelge 3.18 Magnezyum atomunun izotopları

İzotop	Monoizotopik kütle	Bolluk
^{24}Mg	23.985041700	0.7899
^{25}Mg	24.98583692	0.1000
^{26}Mg	25.982592929	0.1101

3.3 Hazırlanan Katyon Çözeltileri

Çizelge 3.19'da kullanılan metal çözeltilerinin hazırlanan stoklarının derişimleri verilmiştir.

Çizelge 3.19 Çalışılan katyonların stok çözeltileri

Katyon bileşigi	Kütlesi	Hazırlanan stok çözeltiler (mM)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OONa}$	82.03	2, 20, 200
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOK}$	98.14	2, 10, 20, 100
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOLi}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	102.02	2, 10, 20, 100
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$	187.56	2, 10, 20, 100
$\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	158.17	2, 10, 20, 100
$\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	214.45	2, 10, 20, 100
$\text{Co}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	249.08	2, 10, 20, 100
$\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$	173.94	2, 10, 20, 100

3.4 Peptit Çözeltilerinin ve Katyon Bileşimlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada peptit derişimi 1 pmol/uL ve 5 pmol/uL olarak alınmıştır.

Na, K, Li, Cu, Ca, Co, Fe, Mg metalleri asetat veya nitrat tuzları şeklinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Çözeltide ise metal derişimleri peptite göre değişen oranlarda eklenmiştir. Farklı oranlarda metal:peptit çözeltileri çalışıldıktan sonra spektrumlar karşılaştırılarak optimum koşullara sahip olan spektrumlar incelenmiştir.

Çizelge 3.20 Çalışma çözeltilerinin metal:peptit oranları

Peptit/Derişimi	Metal	Metal:peptit derişim oranı
NPY 5pmol/uL	Na	100:1, 10:1, 500:1
	K	100:1, 500:1
	Li	100:1, 500:1, 2500:1
	Cu	100:1, 25:1
	Ca	100:1, 500:1, 250:1
	Mg	100:1, 500:1
	Co	100:1, 250:1, 125:1
	Fe	100:1, 250:1
Vpr 1pmol/uL	Na	10:1, 50:1, 100:1
	K	100:1, 500:1
	Li	100:1, 500:1
	Cu	100:1, 500:1, 5000:1
	Ca	100:1, 500:1
	Mg	100:1, 500:1
	Co	100:1, 500:1
	Fe	100:1, 500:1, 5000:1
Betanova 1pmol/uL	Na	10:1, 100:1
	K	100:1, 50:1
	Li	100:1, 500:1, 5000:1
	Cu	100:1, 500:1
	Ca	100:1, 500:1
	Mg	100:1, 500:1
	Co	100:1, 500:1
	Fe	100:1, 500:1, 5000:1

3.5 Q-Tof' un Çalıştırılması ve Kullanılması

Cihaz çalıştırılmadan önce gazların (Gas Cell ve NanoFlow) kapalı olduğundan emin olundu. Yoksa sistem açıldığında ani gaz girişinden dolayı basınç patlamaları olabilir. Çalışmaya başlanmadan önce azot gazı (N₂) ünitesi ve argon gazı üniteleri açıldı.

Monitörden "Analyser Penning" ünitesindeki veriler takip edilerek Q-Tof kasasının yan tarafında bulunan "Gas Cell" basınç ayarından 6.00×10^{-5} olması sağlandı. Diğer sıcaklık ve voltaj ayarları otomatik ve standarttır.

Numuneyi giriş kısmına vermek için özel şırıngalarla çalışıldı. Şırınga önce su, sonra da %40'lık MeCN çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra şırınga tekrar yıkama çözeltisi ile doldurulup, bir tarafı NanoLC girişine bağlı olan kapiler girişine takıldı ve Q-Tof kasası girişindeki şırınga ünitesine yerleştirildi. Menü çubuğundan şırınga imgesi tıklanarak akış başlatıldı. Kütle spektrometresinde numunenin aldığı yol bu şekilde temizlenerek olası spektrum girişimleri önlenmiş oldu.

Yıkama çözeltisi özel şırınga aracılığıyla enjekte edilirken, araç çubuğundan "Quadropol" paneli seçilerek "Collision Energy" başlangıçta 10V'e ayarlandı. Daha sonra deneyler sırasında manuel olarak 10-30V arası değerler girilerek spektrumdaki değişiklikler izlendi. İyi bir akış için;

- NanoLC giriş ünitesinin x, y, z düzlemlerindeki konumu,
- Spektrumun takibi,
- Kapiler voltajı,
- Numune giriş/Sample Cone voltajı (Cone voltajı arttırmak iyon fragmentasyonunu artırır, değiştirmek kalibrasyon ayarını bozmaz),
- Uçuş oranı/Flow rate (Pump Flow, uL/min) önemli etkenlerdir.

Araç çubuğundan "ES+Source" panelinden "Pump Flow (uL/min)" manuel olarak ayarlandı. Şırıngadaki çözelti yıkama çözeltisi olduğundan, 0.6-0.8uL/min gibi bir akış değeri ayarlanabilir. Fakat peptit çözeltileri için bu akış miktarı çoktur ve analitin boşa harcanmasına neden olmaktadır. Önemli çözeltiler için 0.2-0.5pmol/uL değerleri yeterli

gelmektedir. Yüksek sıvı akışlarında optimum kararlılık ve duyarlılık için prop ucu, örnek girişinden olabildiğince uzakta olmalıdır. Düşük akış oranlarında pozisyon daha az kritiktir.

NanoLC ünitesindeki kapilerin, doğru bir akış için x, y, z konumlarının ayarlanması gerekir. Bunun düzgün bir şekilde yapılabilmesi için NanoLC giriş ünitesine bağlı mikroskoptan akış izlendi. Aynı zamanda monitörden cihazın spektrum oluşturup oluşturulmadığı da kontrol edilmelidir ki cihazın okuma yapıp yapmadığı anlaşılabilir.

Koni gaz akışı/Cone Gas Flow, çözücü iyonlarının yoğunluğunu azaltır. Akış değeri, ilgilenilen iyonların (genellikle $(M+H)^+$) yoğunluğunu değiştirmeyecek şekilde çözücü iyonlarının mümkün olduğunca azalmasıyla optimize edildi. Böylece yıkama sırasında akış da ayarlanmış oldu. Cihaz artık daha kompleks çözeltiler için hazır konumdadır.

Numune giriş voltajı genellikle 25-70V arasında yeterlidir (çözücü molekülleri alt sınırı, proteinler üst sınırı tercih ederler). Ayarlama yapılırken yüksek duyarlılığı saptamak için 15 V'den başlayarak 150V'ye kadar yapılan değişiklikler takip edildi.

Daha sonra kalibrasyon çözeltisi hazırlanıp ve MS/Q-ToF kalibre edildi.

3.6 Rezolüsyonun Ayarlanması

- Cihaz %40'lık MeCN ve 0.1'lik FA çözeltisi ile yıkandı.
- LE (2ng/uL) peptit çözeltisi cihaza verildi (%30 MeCN + %0.1 FA).
- Saniye başına düşen iyon sayımı 200 count/s şeklinde ayarlandı.
- LE, $m/z=556$ spesifik pikini vermeye başlaması ile "resolution" ayarlanmasına başlandı.
- Time of Flight araç çubuğundan "ToF Flight Tube" başlığı altındaki 'Puller', 'Pusher' ve 'Pusher Offset' voltajları farklı değerlere ayarlandı.
- İdeal ayarlar, piklerin daha dar görünmesini sağlayan değerlerdir.
Pusher Offset= 0.50V
Pusher= 830.0V

Puller= 650.0V

- ‘‘Spectrum Tool’’ menüsünden ‘‘ResCalc’’ penceresi açıldı. Bu pencerede, geçerli olan rezolüsyon değeri (örn: 4375) ve olması gereken rezolüsyon değeri (örn: 5000) görüldü.
- Değiştirilen değerlerin yarattığı resolution değeri sonucunu kontrol etmek için, her değer değiştirilişinden sonra ‘‘Chromatogram’’ penceresinden ‘‘combine’’ yapıldı (20-30 scan kadar).
- Spectrum penceresi açıldı.
- ‘‘ResCalc’’ sayfası yenilenir (enter) ve değişen rezolüsyon değerine bakıldı.
- İstenilen değer elde edilene kadar ‘‘Chromatogram’’ penceresinden ‘‘combine’’ işlemine yani belli bir aralıktaki sayımın toplanmasına devam edildi.
- ‘Combine’ işlemi bittikten sonra, ‘‘Options’’ başlık çubuğundan ‘‘TDC Settings’’ açıldı.
- Geçerli olan Lteff değeri not edilir (eski Lteff). Buradaki amaç yeni Lteff değerinin hesaplanması.

$$LE= 556.2771 ([M+H+] \text{ formu })$$

- Eğer spektrumda örneğin 554.9869 gibi farklı ama yakın bir değer görünüyorsa, o görülen değer alınabilir.

$$\text{Yeni Lteff} = \text{Eski Lteff} \times \sqrt{[(m/z)_{\text{ölçülen}} / (m/z)_{\text{gerçek}}]}$$

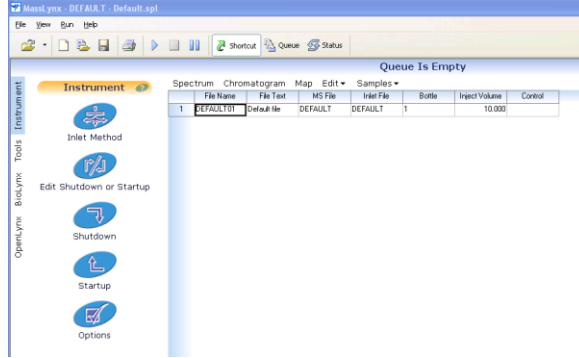
- Bu yeni Lteff değeri, eski Lteff değerinin yerine yazıldı.
- Başlık çubuğundan ‘‘File’’ a tıklanarak ayarlar kaydedildi.

3.7 MS Matematiksel Çözümleme

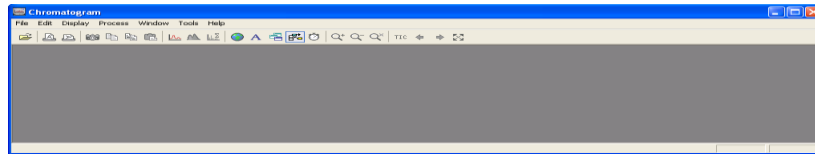
Kütle spektrometresinde elde edilen spektrumlar Windows XP üzerinde çalışan MassLynx programı yardımı ile yorumlanır. Buradaki amaç, spektrumun girişim ve zemin gürültüsünden temizlenip yorumlanabilir hale getirilmesidir.

Cihazın kalibrasyonunda kullandığımız deneme çözeltilerinin birini örnek alarak, MassLynx programı ile yapılan hesaplamalara göz atalım.

Adım 1: Program açılır ve şekil 3.1'deki ana pencere üzerinden şekil 3.2'deki 'chromotogram' menüsü seçildi.

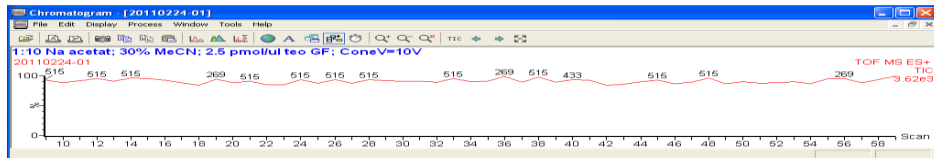


Şekil 3.1 Kütle spektrometresi programı ana sayfası



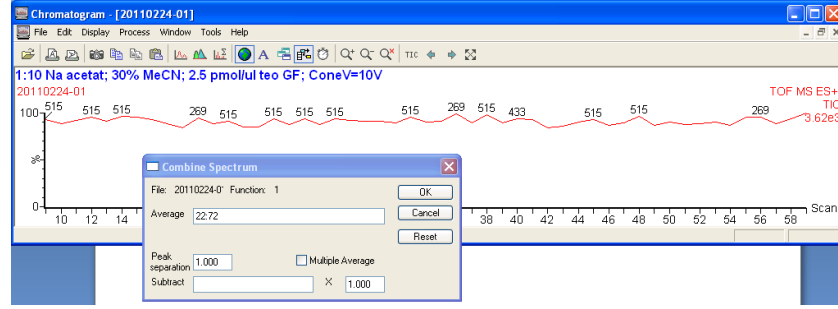
Şekil 3.2 Kromotogram sayfası

Adım 2: Açılan küçük pencerenin 'File' menüsünden üzerinde çalışılacak dosya seçildi.



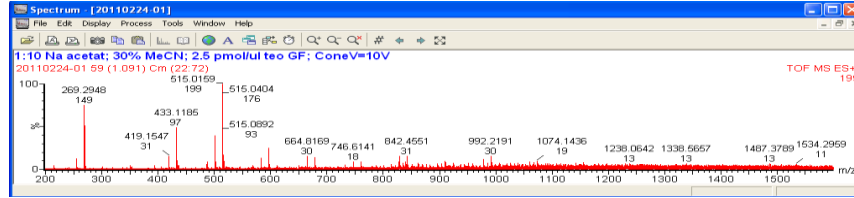
Şekil 3.3 Kromotogram sayfasında örnek bir tarama

Adım 3: 'combine spektrum' alt menüsü açılarak lineer olan tarama/scan aralığı gözlemlendi ve Şekil 3.4'deki menüye verileri girildi.



Şekil 3.4 Örnek taramanın matematiksel seçeneklerinin girilmesi

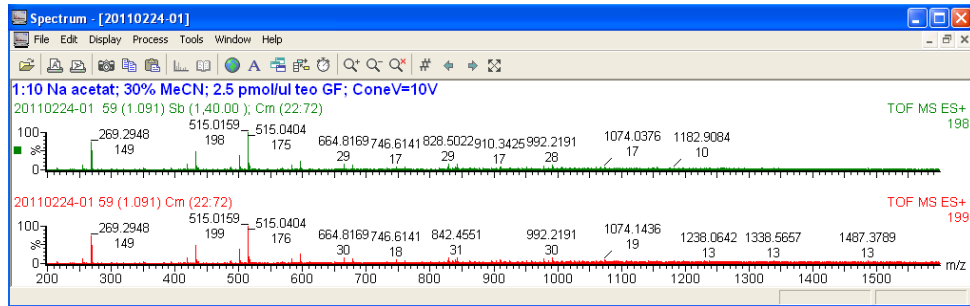
Adım 4: ‘OK’ seçeneğinin ardından, seçilen aralıktaki spektrum yeni bir pencere olarak açıldı.



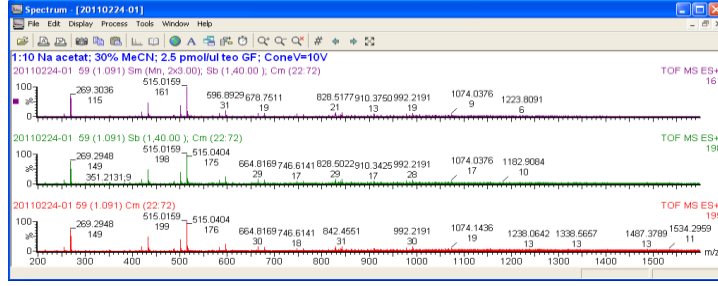
Şekil 3.5 Örnek taramanın elde edilen spektrumu

Adım 5: Eldeki spektrum üzerinde, daha bir sade görünüm elde etmeyi sağlayan matematiksel prosedürü işlenebilir hale gelindi.

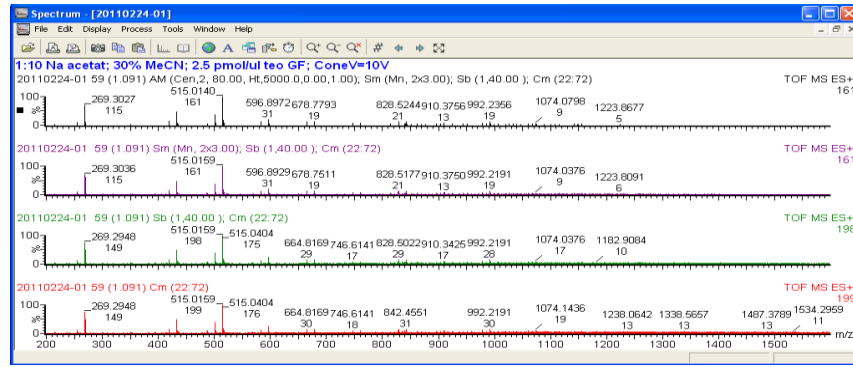
‘Process’ menüsünden sırasıyla Şekil 3.6-3.8’deki ‘subtract’, ‘smooth’ ve ‘center’ işlemleri tıklanarak süreç gerçekleştirildi.



Şekil 3.6 Matematiksel hesaplamaların birinci adımını, ‘Subtract’

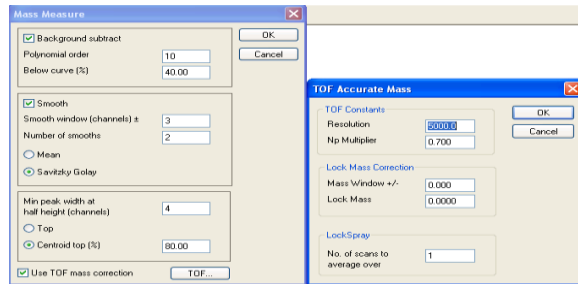


Şekil 3.7 Matematiksel hesaplamamanın ikinci adımını, ‘Smooth’



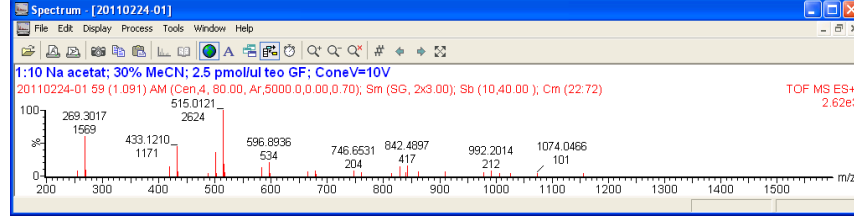
Şekil 3.8 Matematiksel hesaplamamanın üçüncü adımını, ‘Center’

Bu işlemlerin bağlantısı çözüldükten sonra tek tek yapmaya gerek yoktur. MassLynx tüm bu işlemleri bir kere de zaman kaybı olmaksızın gerçekleştirebilmektedir. Bunun için yine ‘Process’ menüsünden ‘Mass Measure’ seçeneği tıklanır. Önce karşımıza seçenekler menüsü çıkmaktadır. Aşağıdaki resimde laboratuarda kullandığımız ayarlar görülmektedir.



Şekil 3.9 QToF ayar penceresi

Tüm bu seçeneklere ‘OK’ denildikten sonra, sonuç spektrumu karşımıza çıktı. Artık geriye spektrumun yorumlanması kalmaktadır (şekil 3.10).



Şekil 3.10 Matematiksel çözümlene sonucu elde edilen spektrum

3.8 ToF Kalibrasyonu

GluFibrinopeptit Tof kalibrasyonunda en çok kullanılan peptitlerden biridir.

Çizelge 3.21 Kalibrasyon çözeltisinde kullanılan peptitlerin iyonik yapıları

Peptide	İyonik yapılar	m/z
Glu-Fib	$[M+2H]^{2+}$	785.8427
LE	$[M+H]^+$	556.28

GF stok= 32 pmol/uL

GF: Glu-Fibrinopeptide B, Sigma F-3261, 1570.57 Da

Peptidin sekansı:

GluGlyValAsnAspAsnGluGluGlyPhePheSerAlaArg;EGVNDNEEGFFSAR

$[M+H]^+$ = Fragman iyonlar

175.1195, 246.1566, 333.1887, 480.2570, 627.3254, 684.3469, 813.3895, 942.4321, 1056.4750, 1171.5020, 1285.544, 1384.6133, 1441.6348

$[M+2H]^{2+}$ = (m/z)= 785.8427

Ürün= şişede 0.1 mg toz halindedir.=64 nmol

2000 uL su eklenir ve 32 pmol/uL çözelti elde edilir.

LE stok hazırlanışı; MV= 556.28 ve elimizde 10 mg/mL stok var.

$$(10 \text{ mg Le}/1.0 \text{ mLH}_2\text{O}) \cdot (1 \text{ mmol}/556.28 \text{ mg LE}) \cdot (10^9 \text{ pmol}/1 \text{ mmol}) \cdot (1 \text{ mL}/10^3 \text{ uL}) \\ = 1.79 \cdot 10^4 \text{ pmol/uL LE}$$

$$(17,910 \text{ pmol/uL})/(20 \text{ pmol/uL})= 900 \text{ kat ve } \sqrt{900}=30$$

Buradan yola çıkarak stoklar hazırlanır;

$$500 \text{ uL (600 pmol/uL)}; 16.75 \text{ uL stok (1.79} \cdot 10^4 \text{ pmol/uL)} + 483.25 \text{ uL H}_2\text{O}$$

$$60 \text{ uL (20 pmol/uL)}; 2 \text{ ul stok (600 pmol/uL)} + 58 \text{ uL H}_2\text{O}$$

Kullanılan çözeltiler;

$$50 \text{ uL}; 10 \text{ pmol/uL LE, 0.1\% FA, 30\% MeCN}$$

$$\text{Hazırlanışı} = 2.5 \text{ uL LE (20 pmol/uL)} + 5 \text{ uL FA (1\%)} + 15 \text{ uL MeCN} + 24.75 \text{ uL H}_2\text{O}$$

$$50 \text{ uL}; 4 \text{ pmol/uL LE, 0.1\% FA, 30\% MeCN}$$

$$\text{Hazırlanışı} = 10 \text{ uL LE (20 pmol/uL)} + 5 \text{ uL FA (1\%)} + 15 \text{ uL MeCN} + 20 \text{ uL H}_2\text{O}$$

$$50 \text{ uL}; 2.5 \text{ pmol/uL GF, 0.1\% FA, 30\% MeCN}$$

$$\text{Hazırlanışı} = 4 \text{ uL GF (32 pmol/uL)} + 5 \text{ uL FA (1\%)} + 15 \text{ uL MeCN} + 26 \text{ uL H}_2\text{O}$$

$$50 \text{ uL}; 2.5 \text{ pmol/uL GF, 6 pmol/uL LE, 0.1\% FA, 30\% MeCN}$$

$$\text{Hazırlanışı} = 4 \text{ uL GF (32 pmol/uL)} + 15 \text{ uL LE (20 pmol/uL)} + 5 \text{ uL (1\%)} + 15 \text{ uL} \\ \text{MeCN} + 11 \text{ uL H}_2\text{O}$$

Kalibrasyonda D çözeltisinin kullanılmasına karar verilmiştir.

3.9 Cihazın Kalibre Edilmesi

Cihazın kalibre edilmesi, spektrumun gereksiz piklerden temizlenmesi ve doğru kütle alanında sonuçlar vermesi için önemlidir.

Numenelerin hazırlandığı çözelti içeriği (formik asit ve metilsiyanyür) kalibrasyon peptidi ile (GF; Glufibrinopeptit) ile hazırlanarak cihaz kalibre edildi. Kütle ölçüm merkezi, GF'nin kütlesine göre karşılaştırma yapılarak, doğru merkeze taşınmış oldu.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Na, K, Li, Cu, Ca, Co, Fe, Mg metalleri asetat veya nitrat tuzları şeklinde peptitlere göre değişen konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Peptitler ile belli oranlarda metal çözeltileri hazırlanıp kütle spektrometresinde fragmentasyon için optimum konsantrasyonlar deneysel olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de bu oranlar verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışılan çözeltilerde optimum çalışma derişimleri

Peptit	Metal	Optimum derişim oranı
NPY	Na	100:1
	K	500:1
	Li	500:1
	Cu	100:1
	Ca	100:1
	Mg	100:1
	Co	250:1
	Fe	100:1
Vpr	Na	100:1
	K	100:1
	Li	500:1
	Cu	500:1
	Ca	500:1
	Mg	100:1
	Co	100:1
	Fe	500:1
Betanova	Na	100:1
	K	100:1
	Li	500:1
	Cu	500:1
	Ca	100:1
	Mg	100:1
	Co	500:1
	Fe	500:1

Çalışma çözeltilerinde genel olarak %50 CH₃CN (metil siyanür, asetonitril) kullanılmıştır. Metil siyanür, elektrosepreyde uçuculuk sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Konsantrasyonun yanı sıra parçalanma enerjileri (CE) de spektrumlar üzerinde etkiye sahiptir. Bu nedenle aynı çözelti CE değerleri değiştirilerek de çalışılmıştır.

Nöropeptit Y (NPY) ilave edilmiş metal çözeltisigiriş kısmında CID olan kütle spektrometresine özel şırınga yardımıyla koyulmuştur. Burada fragmanlarına ayrıldıktan sonra m/z oranları belirlenmiştir. Elde edilen bu oranlardan parçalanma ürünlerinin protolanmış, metallenmiş veya iyon kümeleri şeklinde olup olmadıkları belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar çizelge 4.1'de verilmektedir. Yapılan hesaplamalardan iyon kümelerindeki n değeri 3 olan iyon kümesi en fazla gözlenmiş, bunun arkasından da n değeri 15 ve 17 olanlar gelmiştir. K iyonu için bakılacak olursa, n değerleri 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 olabilmektedir. Li örneğinde ise iyon kümelerinde en fazla gözlenen n değeri 1, 2, 3, 4 olarak bulunmuştur. Bakır nitrat tuzu kullanılarak yapılan metal deneylerinde bunun tersi bir durum gözlenmiştir. Burada bakır metalinin iyon kümeleri oluşturmayıp peptite bağlandığı gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada metal iyonlarının etkisi üzerine gidilmiştir. Kalsiyum metali(asetat tuzu) ile yapılan çalışmalarda iyonların büyük bir kısmı ortamda bulunan formik asitten dolayı protonlanmış veya metallenmiş yapılar oluşturmuştur. Az miktarda da iyon kümesi meydana gelmiştir.

Çizelge 4.2 NPY peptiti için gözlenen iyonik ürünler

Metal	Protonlanmış/ Metallenmiş yapı	İyon kümesi	Oluşan yapılar
Na	-	$[n\text{NaOOCCH}_3 + \text{Na}]^+$	n= 3 en çok n=15-17' de gözlenmiştir
K	-	$[n\text{KOOCCH}_3 + \text{K}]^+$	n= 1, 2, 3, 4, 5, 6
Li	-	$[n\text{LiOOCCH}_3 + \text{Li}]^+$	n= 1, 2, 3, 4,
Cu	$[\text{Pep} + 4\text{H}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 5\text{H}]^{+5}$ $[\text{Pep} + 2\text{H} + \text{Cu}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 3\text{H} + \text{Cu}]^{+5}$	-	
Ca	$[\text{Pep} + 3\text{H}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 4\text{H}]^{+4}$ $[\text{Pep} + \text{H} + \text{Ca}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 2\text{H} + \text{Ca}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 3\text{H} + \text{Ca}]^{+5}$ $[\text{y}21 + 3\text{H} + \text{Ca}]^{+2}$	$[\text{mCa}(\text{OOCCH}_3) + n\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}]^{+2}$	(m,n)= (3,0) (5,0) (7,0), (9,0) (11,0) (13,0)
Co	$[\text{Pep} + 3\text{H}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 4\text{H}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 2\text{H} + \text{Co}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 3\text{H} + \text{Co}]^{+5}$	$[3\text{Co}(\text{OOCCH}_3)_2 + \text{Co}]^{+2}$ $[3\text{Co}(\text{OOCCH}_3)_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Co}]^{+2}$ $[3\text{Co}(\text{OOCCH}_3)_2 + 4\text{H}_2\text{O} + \text{Co}]^{+2}$	
Fe	$[\text{Pep} + 3\text{H}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 4\text{H}]^{+4}$ $[\text{Pep} + \text{H} + \text{Fe}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 2\text{H} + \text{Fe}]^{+4}$ $[\text{Pep} + 3\text{H} + \text{Fe}]^{+5}$	$[\text{mFe}(\text{OOCCH}_3)_2 + n\text{H}_2\text{O} + k\text{CH}_3\text{CN} + \text{Fe}]^{+2}$	(m, n, k)= (3, 0, 0), (3, 2, 0), (3, 0, 2), (3, 8, 0), (5, 0, 0), (7, 0, 0), (7, 8, 0)
Mg	$[\text{Pep} + 3\text{H}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 4\text{H}]^{+4}$ $[\text{Pep} + \text{H} + \text{Mg}]^{+3}$ $[\text{Pep} + 2\text{H} + \text{Mg}]^{+4}$	$[\text{mMg}(\text{OOCCH}_3)_2 + n\text{H}_2\text{O} + \text{Mg}]^{+2}$	(m, n)= (3, 4), (3, 0), (5, 0), (7, 0), (9, 0), (11, 0), (13, 0), (15, 0)

Vpr peptiti için çizelge 3.8 ve çizelge 3.10'da öngörülen protonlanmış ve metal bağlı peptit yapıları gözlenmemiştir. Metaller peptitlerden daha çok kendi aralarında iyonik etkileşimlere girerek iyon kümeleri oluşturmuşlardır. Bu iyon kümeleri asetat ve/veya su moleküllerinin metal katyonu ile bir araya geldiği yapılar olabilmektedir. (m,n)=(9,16) gibi yüksek sayılarda atom taşıyan kümelenmeler meydana gelmiştir. Vpr peptiti için metal katyonunun neden olduğu bir parçalanma türü ise gözlenmemiştir.

Çizelge 4.3 Vpr peptiti için gözlenen iyonik ürünler

Metal	Protonlanmış/ Metallenmiş yapı	İyon kümesi	Oluşan yapılar
Na	-	[nNaOOCCH ₃ + Na]+	n= 3 en çok n= 15-17 de gözlenmiştir
K	-	[nKOOCCH ₃ + K]+	n= 1, 2, 3, 4, 5, 6
Li	-	[nLiOOCCH ₃ + Li]+	n= 1, 2, 3, 4,
Cu	-	-	
Ca	-	[mCa(OOCCH ₃) + nH ₂ O +Ca]+2	(m, n)= (3,0), (3,2), (3,4), (5,0), (5,2), (5,4), (5,8), (7,0), (7,1), (7,16), (9,0), (9,16), (11,0), (13,0), (15,0)
Co	-	[3Co(OOCCH ₃) ₂ + Co]+2 [3Co(OOCCH ₃) ₂ + H ₂ O+ Co]+2 [3Co(OOCCH ₃) ₂ +4H ₂ O+Co]+2	
Fe	-	[mFe(OOCCH ₃) ₂ + nH ₂ O + kCH ₃ CN + Fe]+2 [aFe(OOCCH ₃) ₂ + bH ₂ O + Fe]+2	(m, n, k)= (3, 0, 0), (3, 2, 0), (3, 0, 2), (3, 8, 0), (5, 0, 0), (7, 0, 0), (7, 8, 0) (a,b)= (3,0), (3,2), (3,8), (5,0), (7,0), (9,0), (11,0)
Mg	-	[mMg(OOCCH ₃) ₂ + nH ₂ O + Mg]+2	(m, n)= (3, 0), (7, 0), (11, 0), (13, 0), (15, 0)

Betanova peptiti +2 yüklü olan metal katyonlarıyla etkileşim vermiştir. Özellikle Mg⁺² katyonu ile [y₃ + Mg]⁺² parçalanma ürünü oluşturmuştur. Aynı zamanda çizelge 4.3'deki iyonlar ve iyon kümeleri gözlenmiştir. Bu peptitin çalışmalarında da asetatın katıldığı iyon kümeleri meydana gelmiştir.

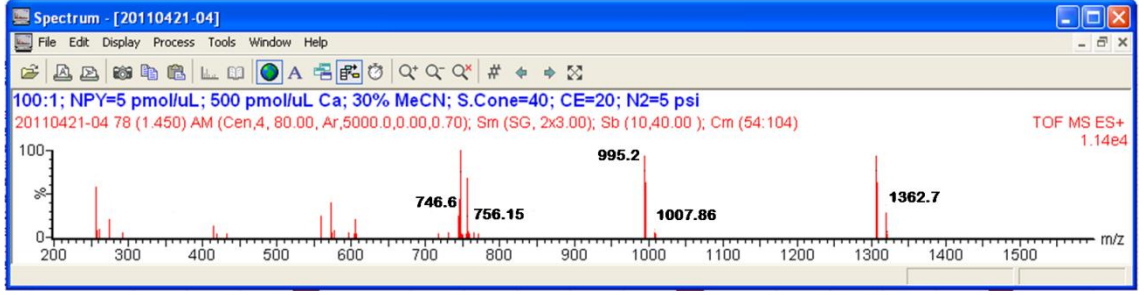
Çizelge 4.4 Betanova peptiti için gözlenen iyonik ürünler

Metal	Protonlanmış/ Metallenmiş yapı	İyon kümesi	Oluşan yapılar
Na	-	[nNaOOCCH ₃ + Na] ⁺	n= 3 en çok n= 15-17 de gözlenmiştir
K	-	[nKOOCCCH ₃ + K] ⁺	n= 1, 2, 3, 4, 5, 6
Li	-	[nLiOOCCH ₃ + Li] ⁺	n= 1, 2, 3, 4
Cu	[Pep + 3H] ⁺³ [Pep + 4H] ⁺⁴ [Pep + 2H + Cu] ⁺⁴	-	
Ca	[Pep + 3H] ⁺³	[mCa(OOCCH ₃) + nH ₂ O + Ca] ⁺²	(m,n)= (3,0), (5,0), (7,0), (9,0)
Co	[Pep + 2H + Co] ⁺³	[5Co(OOCCH ₃) ₂ + Co] ⁺² [7Co(OOCCH ₃) ₂ + H ₂ O + Co] ⁺² [9Co(OOCCH ₃) ₂ + H ₂ O + Co] ⁺² [3Co(OOCCH ₃) ₂ + nH ₂ O + Co] ⁺²	n= 0, 2, 4
Fe	[Pep + 3H] ⁺³ [Pep + 4H] ⁺⁴ [Pep + 2H + Fe] ⁺⁴	[mFe(OOCCH ₃) ₂ + nH ₂ O + kCH ₃ CN + Fe] ⁺² [3Fe(OOCCH ₃) ₂ + Fe] ⁺²	(m, n, k)= (3, 0, 0), (3, 2, 0), (3, 0, 2), (3, 8, 0), (5, 0, 0), (7, 0, 0), (7, 8, 0)
Mg	[Pep + 4H] ⁺⁴ [Pep + 2H + Mg] ⁺⁴ [y ₃ + Mg] ⁺²	[mMg(OOCCH ₃) ₂ + nH ₂ O + Mg] ⁺²	(m, n)= (3, 4), (3, 0), (5, 0), (7, 0), (9, 0), (11, 0), (13, 0), (15, 0)

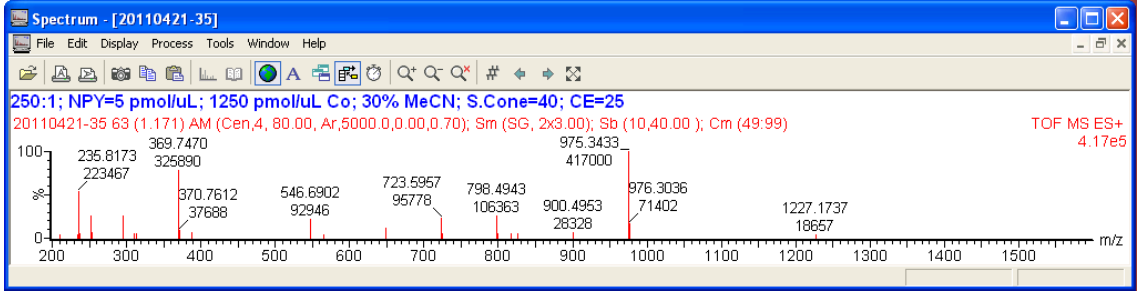
Her peptit:metal çözeltisi için optimum koşulların elde edilen spektrumlar aşağıda verilmiştir. Görüldüğü üzere ortamda sinyal veren pek çok tür bulunmaktadır.

En yüksek yoğunlukta olan yani en yüksek sinyale sahip olan iyonun yoğunluğu 100% olarak alınır. Diğer iyonların yoğunlukları da bu iyona göre hesaplanarak bağıl yoğunlukları elde edilir.

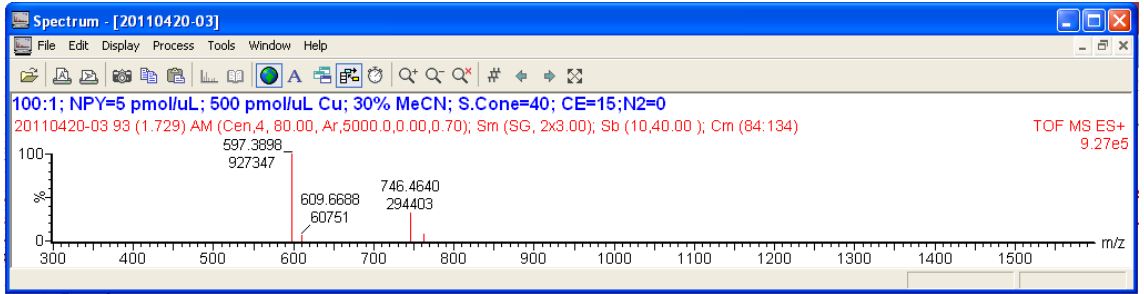
Aşağıdaki spektrumlardan her biri, m/z değerine karşı iyonların bağıl yoğunluklarının grafiğe alınmasıyla elde edilir. Farklı metal:peptit oranları parçalanma enerjileri değiştirilerek çalışılmıştır. Zemin gürültüsünün piklerle karışmadığı spektrumlar optimum olarak seçilmiş ve aşağıda sıralanmıştır.



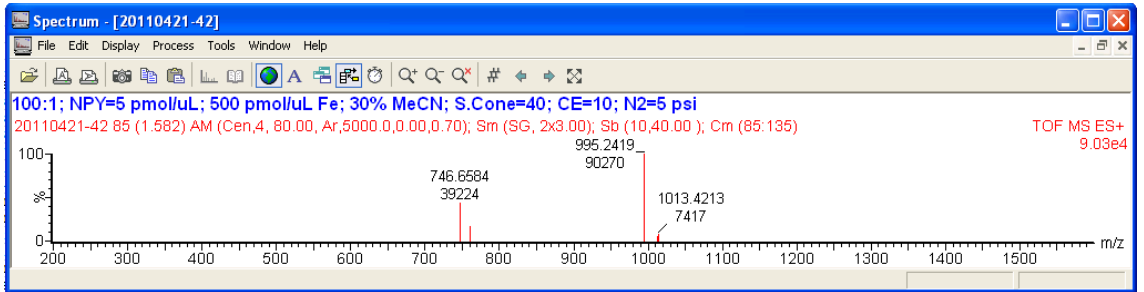
Şekil 4.1 NPY:Ca çözeltisi için optimum koşullar



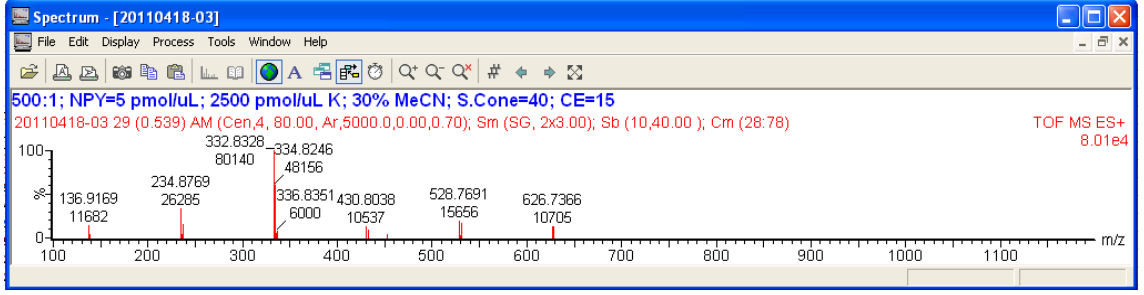
Şekil 4.2 NPY:Co çözeltisi için optimum koşullar



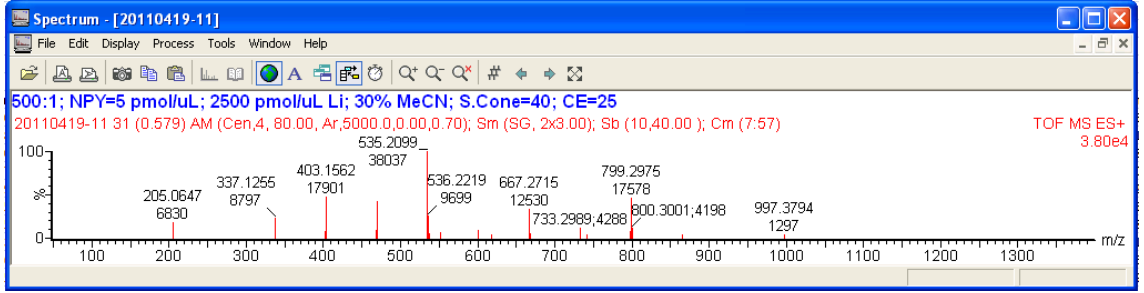
Şekil 4.3 NPY:Cu çözeltisi için optimum koşullar



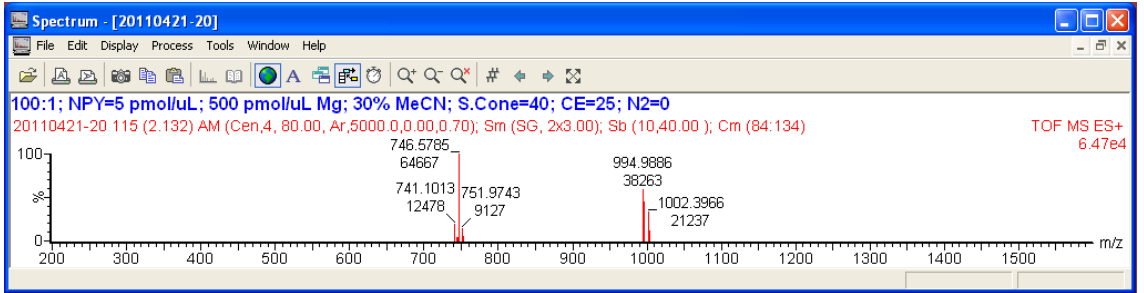
Şekil 4.4 NPY:Fe çözeltisi için optimum koşullar



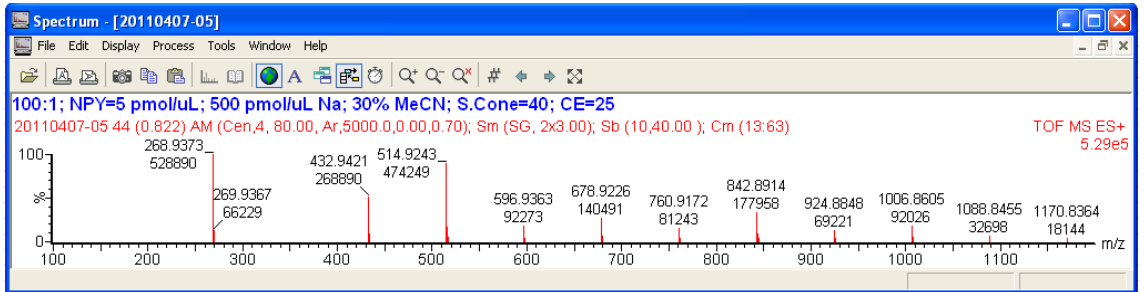
Şekil 4.5 NPY:K çözeltisi için optimum koşullar



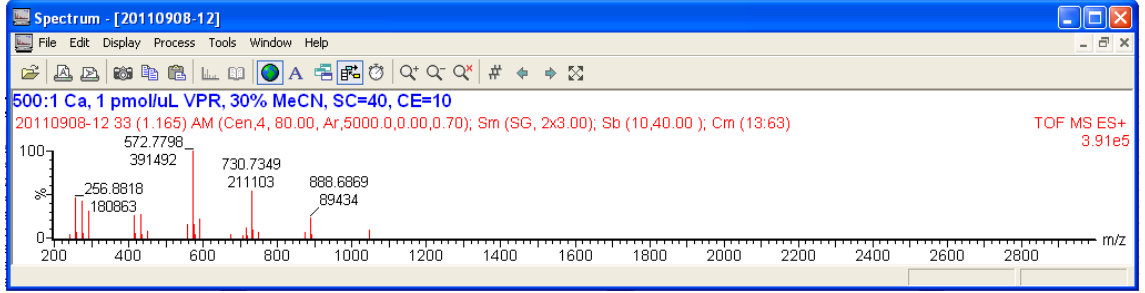
Şekil 4.6 NPY:Li çözeltisi için optimum koşullar



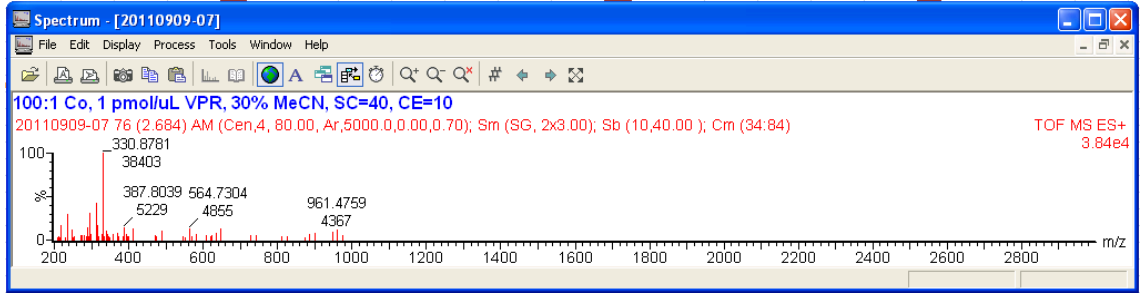
Şekil 4.7 NPY:Mg çözeltisi için optimum koşullar



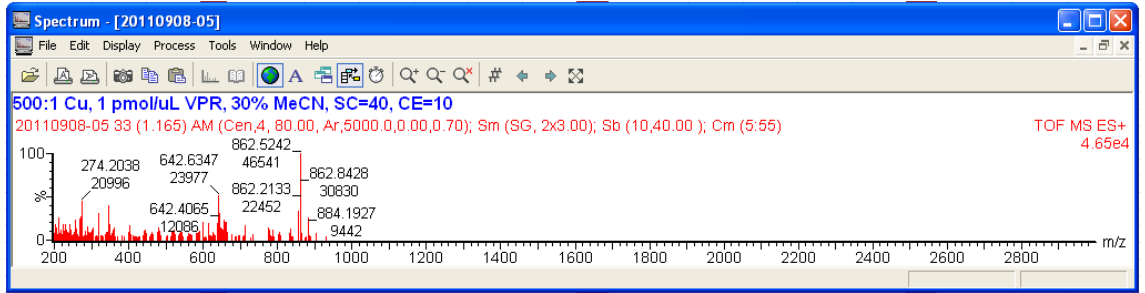
Şekil 4.8 NPY:Na çözeltisi için optimum koşullar



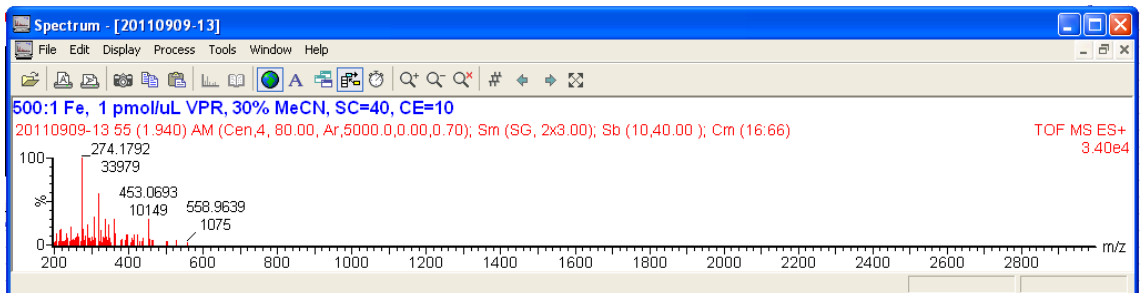
Şekil 4.9 Vpr:Ca çözeltisi için optimum koşullar



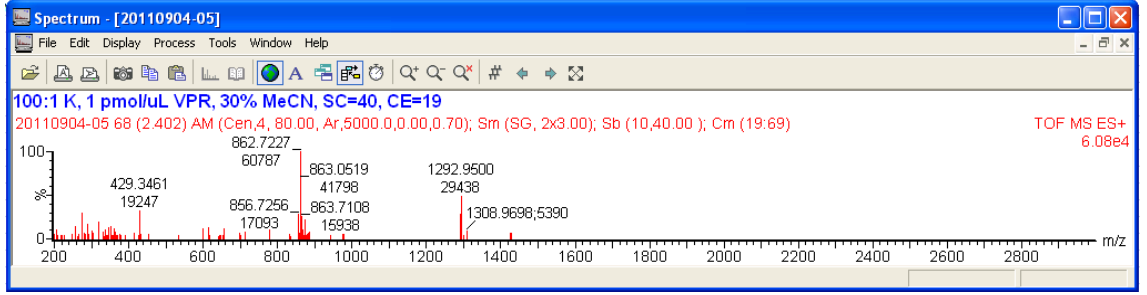
Şekil 4.10 Vpr:Co çözeltisi için optimum koşullar



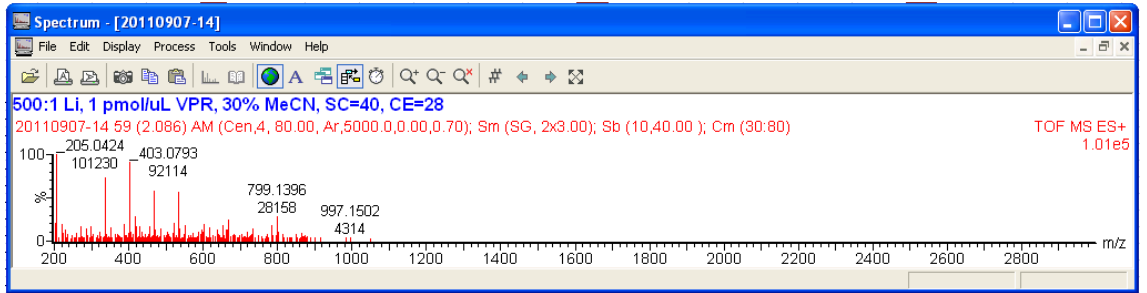
Şekil 4.11 Vpr:Cu çözeltisi için optimum koşullar



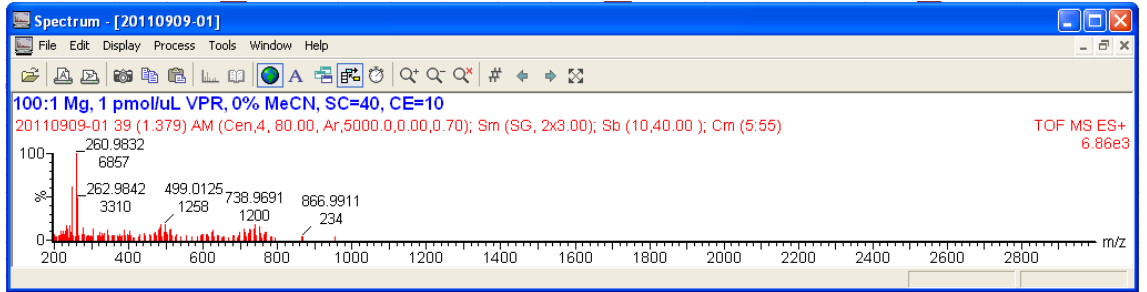
Şekil 4.12 Vpr:Fe çözeltisi için optimum koşullar



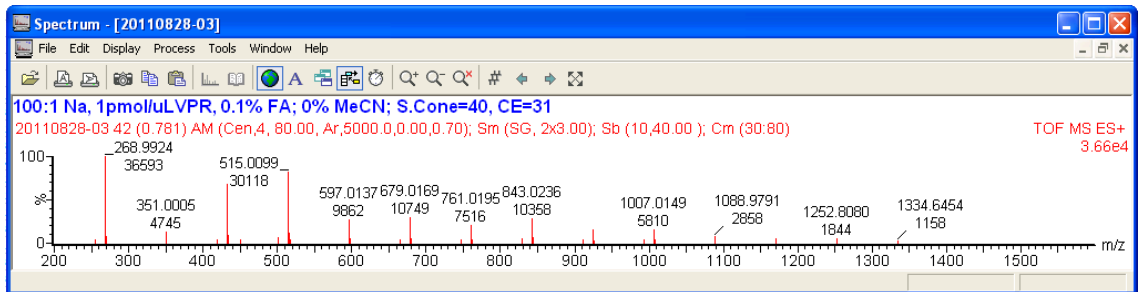
Şekil 4.13 Vpr:K çözeltisi için optimum koşullar



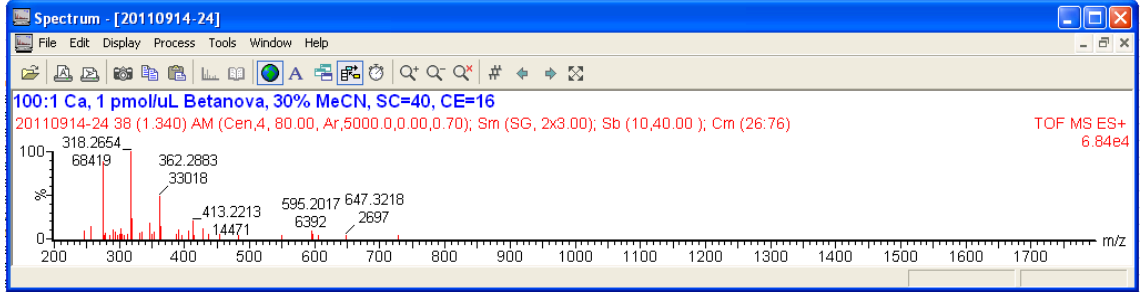
Şekil 4.14 Vpr:Li çözeltisi için optimum koşullar



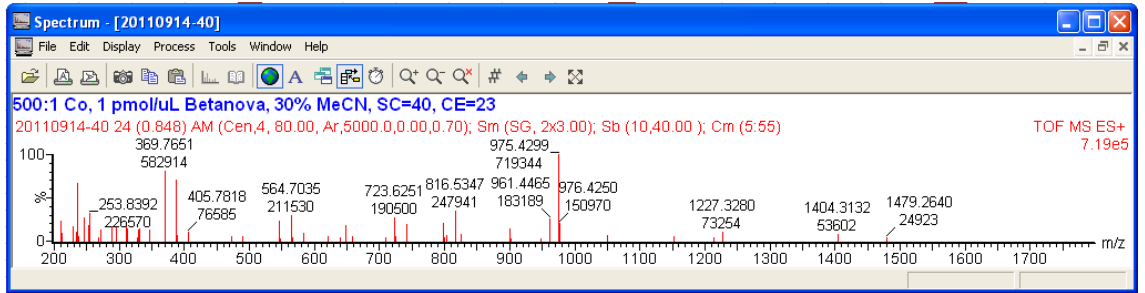
Şekil 4.15 Vpr:Mg çözeltisi için optimum koşullar



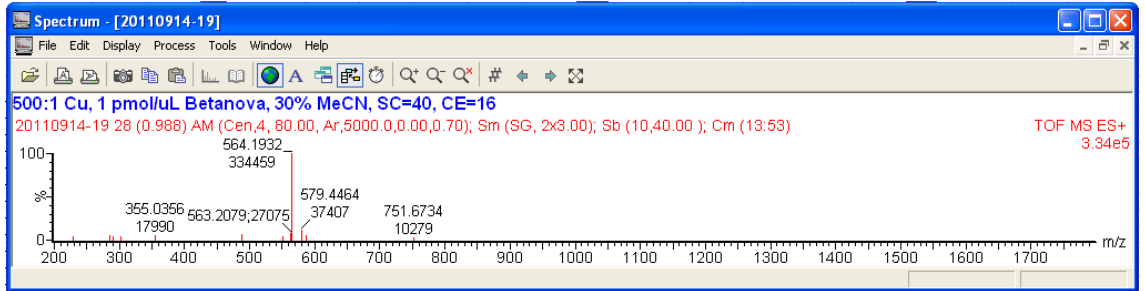
Şekil 4.16 Vpr:Na çözeltisi için optimum koşullar



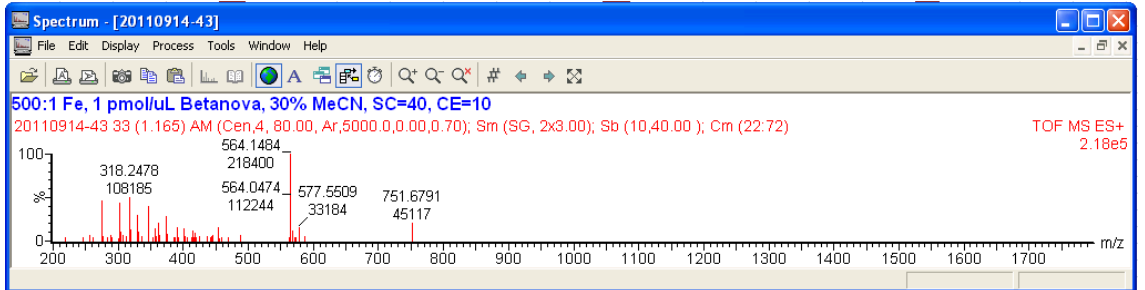
Şekil 4.17 Betanova:Ca çözeltisi için optimum koşullar



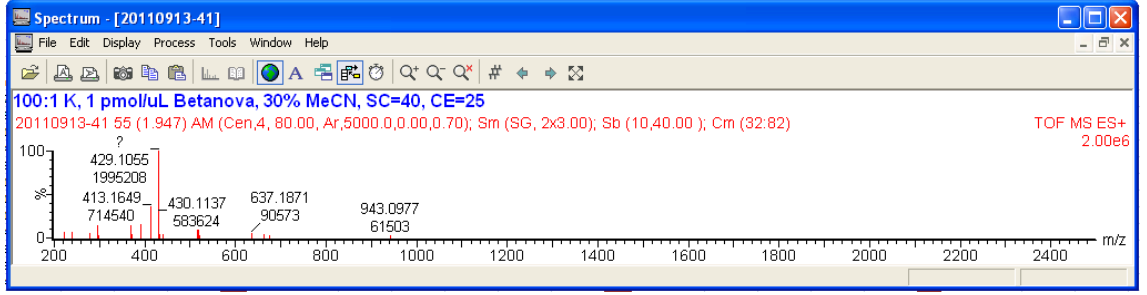
Şekil 4.18 Betanova:Co çözeltisi için optimum koşullar



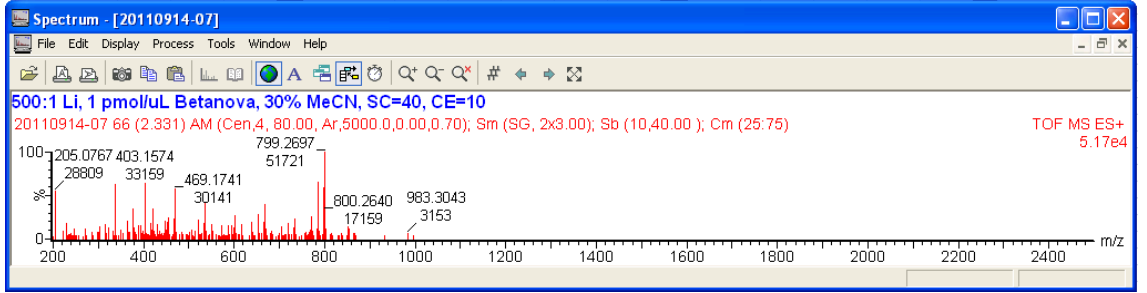
Şekil 4.19 Betanova:Cu çözeltisi için optimum koşullar



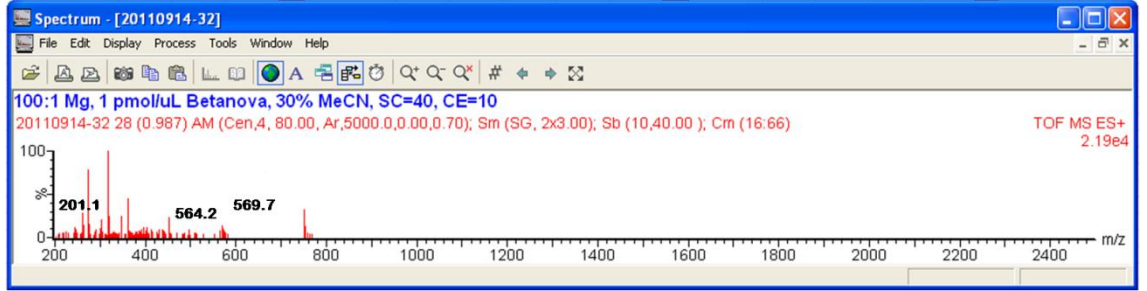
Şekil 4.20 Betanova:Fe çözeltisi için optimum koşullar



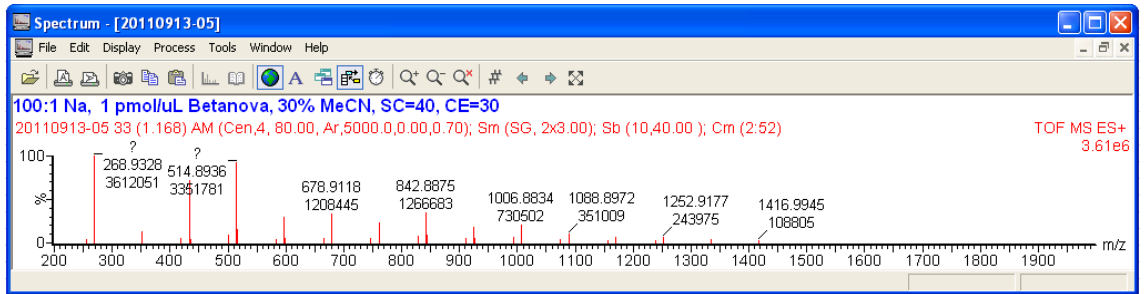
Şekil 4.21 Betanova:K çözeltisi için optimum koşullar



Şekil 4.22 Betanova:Li çözeltisi için optimum koşullar



Şekil 4.23 Betanova:Mg çözeltisi için optimum koşullar



Şekil 4.24 Betanova:Na çözeltisi için optimum koşullar

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

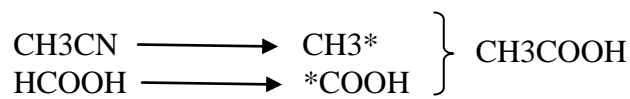
Peptitlerle belli oranlarda asetat veya nitrat tuzları şeklinde hazırlanan metal çözeltileri (Na, K, Li, Cu, Ca, Co, Fe, Mg metalleri) fragmentasyon için kütle spektrometresine koyularak optimum konsantrasyonlar deneysel olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de bu oranlar verilmektedir. Optimum konsantrasyonla belirtilmek istenen, bir peptit türünün her tarama sırasında (1 dakikalık bir okumada saniye başı tarama, 60 arama demektir) yakın bağıl yoğunluklar vermesidir ve okunabilir olmasıdır. İnişli çıkışlı ve değişen değerlerin olduğu spektrumların yorumlanması güvenilir değildir.

Spektrum incelenirken, ortamda en çok bulunan iyonun %100 yoğunlukta olduğu kabul edilir ve diğer iyonların yoğunluğu da buna göre hesaplanır ve böylece bağıl yoğunluklar ortaya çıkar. Ortamda peptit türlerinin dışında da çok fazla iyon türü vardır. Küçük kütleli iyonların da varlığıyla düşük yoğunlukta zemin gürültüsü dediğimiz pik kalabalığı oluşur. Genellikle yüksek parçalanma enerjisi koşullarında büyük kütleli iyonlar parçalanıp bu iyonları oluştururlar ya da kaybolurlar.

Optimum spektrumlara bakıldığında pek çok sinyal olduğu görülmektedir. Bu sinyaller kütle değeri açıklanamayan yapılara aittir.

Bizim çalışmamızda Cu iyon kümesi oluşturmamıştır. Literatürde bakır nitrat kullanıldığı bir çalışmada negatif iyon modunda peptite Cu bağlandığı görülmüştür (Crizer 2009).

Asetatın katıldığı iyon kümeleri, asetat tuzlarının eklendiği çözeltilerde gözlemlendiği gibi nitrat tuzu olarak eklenen metallerin spektrumlarında da ortaya çıkmıştır. Bunun başlıca nedeni, elektrosprey altında parçalanma enerjisine maruz kalan formik asit ve asetonitrilin olduğu düşünülmüştür.



Hesaplanan değerlerin olduğu tablolarla ölçülen değerlerin olduğu spektrumlardaki veriler karşılaştırılarak sinyal veren moleküllerin yapıları tahmin edilmeye çalışılmıştır. Ancak bölüm 3’de verilen protonlanmış veya metallenmiş yapıların çoğuyla karşılaşılmamıştır. Bunun nedeni metallerin beklenmeyen kümelenmeleridir.

Konsantrasyonun yanı sıra parçalanma enerjileri (CE) de spektrumlar üzerinde etkiye sahiptir. Bu nedenle aynı çözelti CE değerleri değiştirilerek de çalışılmıştır. Bu etki oluşan iyonların miktarlarının parçalanma enerjisi arttıkça artması şeklindedir. Hatta yüksek CE değerlerinde bazı sinyallerin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Bunun nedeni parçalanma nedeniyle iyonların yok olmasıdır.

Elde edilen sonuçlar özet halinde çizelge 5.1’de verilmektedir. Çizelgeye bakıldığında Na, K ve Li metal çözeltileri kullanıldığında iyonik peptit yapıları gözlenmemiştir, yani metaller peptide bağlanmadığı ve +1 yüklü metallerin iyon kümeleri şeklinde toplandığı gözlenmiştir. Bunun nedeninin bölüm 2’de açıklandığı gibi ortamda bulunan formik asit ve metallerin asetat veya nitrat tuzları halinde olmalarından dolayı asetat+metal şeklinde iyonlaşmaları daha baskın olduğu için metal peptide bağlanamamıştır. Tüm bu etkileşimler atomların elektron ilgileri, moleküllerin bağ enerjileri gibi termodinamik hesaplamalarla açıklanabilecek olaylardır.

NPY spektrumunda gözlenebilecek olası yapılar çizelge 4.2’de verilmiştir.

Vpr spektrumunda gözlenebilecek olası yapılar çizelge 4.3’de verilmiştir.

Betanova spektrumunda gözlenebilecek olası yapılar çizelge 4.4’de verilmiştir.

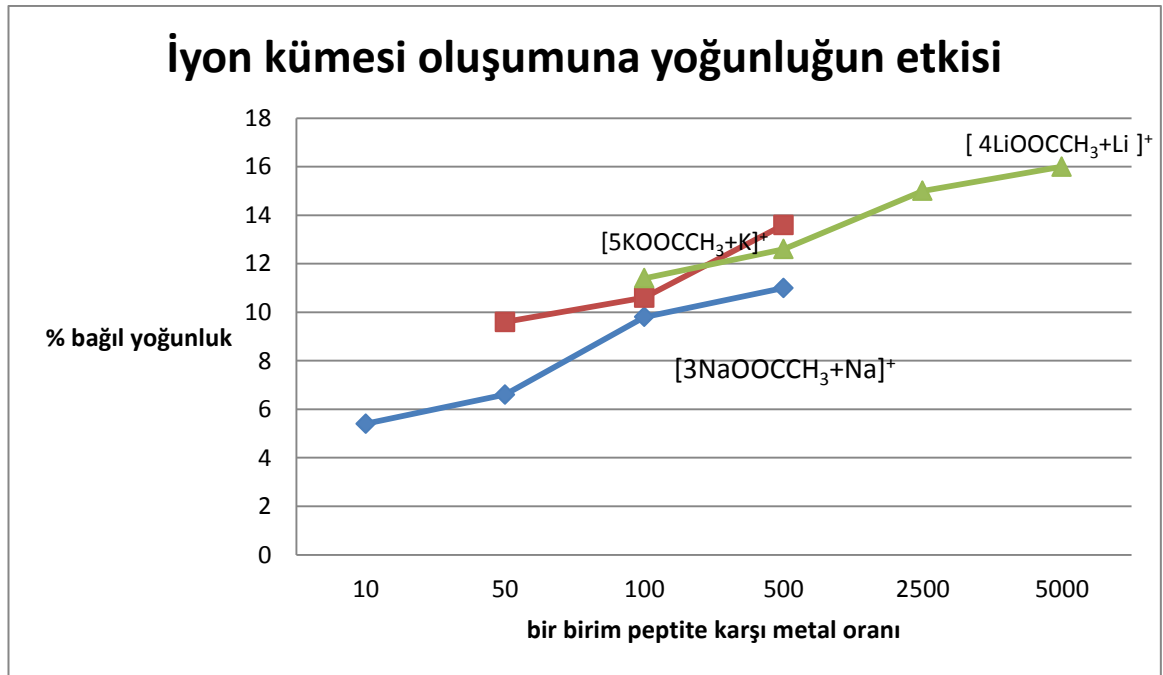
5.1 Na, K, Li Katyonlarının Etkileri

Choi vd (2009)’da aminoasitlerle yaptığı çalışmada gözlenen $[M+H]^+$ ve $[M+Na]^+$ türleri, Na-peptit çalışma çözeltilerimizde gözlenmemiştir. Sadece iyon kümeleri ortaya çıkmıştır. Sung-Seen Choi, bazik ortamda serin (S), treonin (T), asparajin (N), glutamin (Q) polar aminoasitlerinin, $[nAa-nH+(n+1)Na]^+$ türlerini oluştuğunu keşfetmiştir (Aa; aminoasit). Biz ise asidik ortamda çalıştığımız ve yalın halde aminoasitlerle çalışmadığımız için proton ayrılması sonucu Na katılmasıyla oluşan bu türler

oluşmamıştır, yani aminoasitler yalın olarak ortamda gözlenmemiştir. Kullandığımız K, Na ve Li katyonları iyon kümelerine katılmışlardır.

Çalışmalarımızda metal:peptit oranları 100:1 ve 2500:1 arası miktarlarda Na, Li ve K asetat çözeltileri kullanılmasına rağmen, metal bağlı iyonik kalıntıya hiç rastlanmamıştır. Spektrumu yalın tutmak amacıyla parçalanma enerjisinin düşük ve optimal olmasına dikkat edilmiştir. Bu nedenle büyük kütleli (n=5, 6) iyon kümelerinin bağıl yoğunluğu %20'den azken küçük olanlar zemin gürültüsü ile karışmıştır. Ayrıca tüm peptit çözeltilerinde, Na, Li ve K katyonları için aynı iyon kümeleri gözlenmiştir. Bu sonuç, iyon kümelerinin peptit türünden bağımsız olduğunu göstermektedir.

Peptit türüne bakmaksızın, kullanılan metal:peptit oranlarını, oluşan iyon kümelerinin yüzde bağıl yoğunluklarına karşı grafiğe aldık. İyon kümesi olarak en çok gözlenen n değerindeki türü ele aldık (çizelge 4.2).



Şekil 5.1 İyon kümesi oluşumuna yoğunluğun etkisi

Şekil 5.1’de Na, K ve Li katyonlarının oluşturduğu iyon kümelerinin metal:peptit konsantrasyonuna göre değişen bağıl yoğunlukları gösterilmektedir. İyon türlerinin yoğunluklarının en belirgin olduğu spektrumlar ele alınmıştır. Bu katyonların iyon kümesi oluşumu peptit türünden bağımsız olmuştur.

Tek yüklü bu metal katyonlarının, bir proton gibi hareket ettiği ve proton ile yer değiştirme mekanizması ile peptite bağlandığı ve toplam yükü dengeleyip parçalanmaya engel teşkil edebileceği düşünülmüştür. Unutulmamalıdır ki, iyon olmayan türler kütle spektrometresinde pik vermezler.

5.2 Ca, Co, Mg, Fe, Cu Katyonlarının Etkileri

Gross vd (1998)’de yaptıkları çalışmaya göre; aspartat (D), glutamat (E) ve arginin (N) kalıntıları, Ca bağlayan proteinlerde Ca-bağlama noktalarıdır. Genellikle 1, 3, 5, 7 ve 12 pozisyonlarındaki karbonil, karboksil ve aromatik olmayan yan zincirler etkilenir. Peptit zincirindeki asidik kalıntı sayısı arttıkça, Ca-bağlı iyon türler protonlanmış türlere göre artmıştır. Ca, Co ve Fe katyonları için, metal N-terminale yakınsa y ve z; C-terminale yakınsa b ve c parçalanma iyon türlerinin oluşacağı ileri sürülmüştür. DANADG, DRADNA, DDRANV peptitleri y₅iyonu vermezken DENADG vermiştir. Bu Ca’ nın DE’ ye bağlandığını göstermiştir.

Smith vd (2000)’de yaptığı çalışmaya göre, Arg kalıntısı dışında bir kalıntıya bağlanan H⁺, hareketli protondur. Yani ana zincir ya da yan zincir boyunca taşınarak parçalanmaya neden olan reaksiyonlara engel teşkil ederler. Eğer peptitte Arg, His ya da Lys gibi fonksiyonel kalıntılar varsa, bu kalıntılara yakın bağlar uygun şartlar altında parçalanır denmiştir.

Atom çapı Ca > Mg > Fe > Co > Cu

e- ilgisi Cu > Co > Fe > Ca > Mg

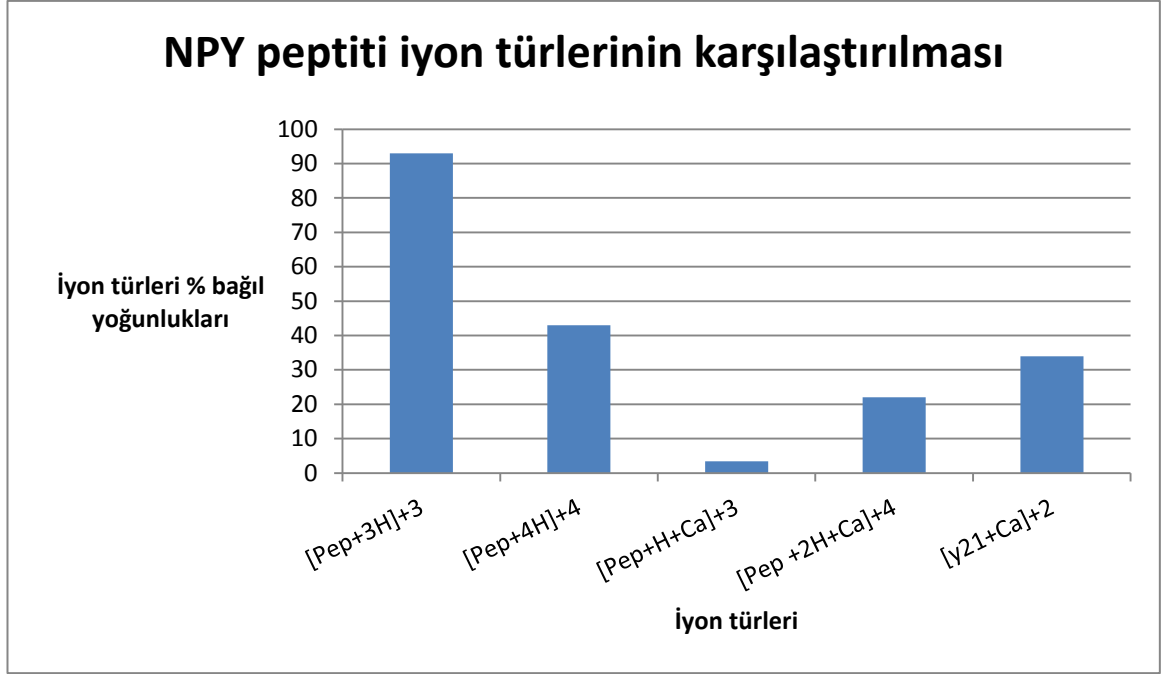
Çizelge 5.1 Kullanılan peptitler ve oluşturdukları iyon çeşitleri

Peptit	Protonlanmış tür	Metal bağlanmış tür	Parçalanma ürünü	Parçalanmaya neden olan metal	
NPY	[Pep + 3H]+3 [Pep + 4H]+4 [Pep + 5H]+5	[Pep + 2H + Cu]+4	[y ₂₁ +3H+ Ca]+2	Ca	
		[Pep + 3H + Cu]+5			
		[Pep + H + Ca]+3			
		[Pep + 2H + Ca]+4			
		[Pep + 3H + Ca]+5			
[Pep + 2H + Co]+4	-	-	-		
[Pep + 3H + Co]+5					
[Pep + H + Fe]+3					
[Pep + 2H + Fe]+4					
[Pep + 3H + Fe]+5					
[Pep + H + Mg]+3	-	-	-		
[Pep + 2H + Mg]+4					
[Pep + 3H]+3				[y ₃ + Mg]+2	Mg
[Pep + 4H]+4					
[Pep + 2H + Cu]+4					
[Pep + 2H + Co]+3					
[Pep + 2H + Fe]+4					
[Pep + 2H + Mg]+4	-	-	-		

+2 yüklü metallerin oluşturduğu iyon kümelerinin bağıl yoğunluklarının % 10'un altında olduğu görülmüştür.

Peptitler asidik ortamda ve metallerin bulunduğu çözeltilerde protonlanmış türler oluşturmuştur. Protonlar asidik aminoasitlerin dışında amino veya hidroksil kalıntılarında etkimmiştir. Protonların yerlerini belirlemek mümkün değildir.

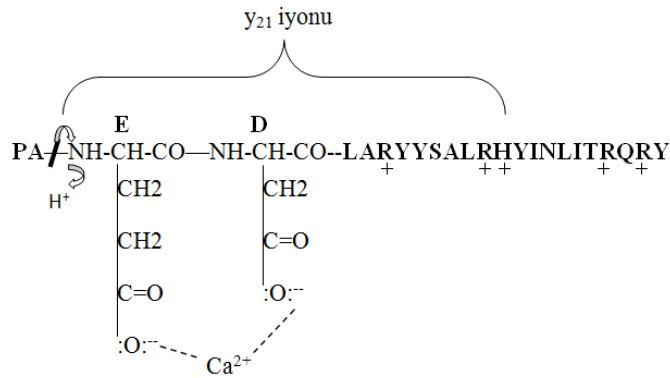
NPY peptiti için Ca katyonu ile çalışırken, [y₂₁+3H+Ca]⁺ parçalanma ürünü iyonları %33 bağıl yoğunlukta gözlenmiştir. Bu iyon [Pep+H+Ca]⁺³ , [Pep+2H+Ca]⁺⁴ , [Pep+3H+Ca]⁺⁵ iyon türlerinin birinin ya da birkaçının parçalanmasıyla oluşmuş olabilir. Bu türlerin kütleleri birbirine yakındır.



Şekil 5.2 NPY peptitinden oluşan iyon türlerinin bağlı yoğunluklarının karşılaştırılması

Önerilen reaksiyon mekanizması;

NPY;



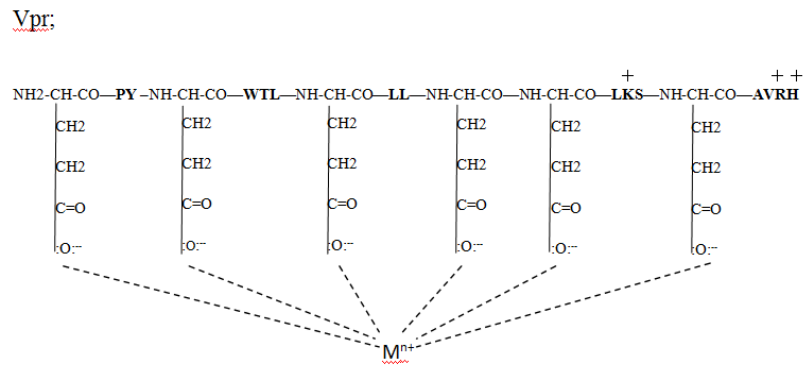
Şekil 5.3 NPY peptit zincirinin Ca²⁺ metaliyle etkileşimi

NPY peptiti çalışmasında görüldüğü gibi, Ca katyonu, DE dipeptidine bağlanarak y iyonu verme eğilimindedir. Bunu daha önce Gross'un çalışmasında da görmüştük. Diğer peptitlerde (Vpr ve Betanova) E kalıntıları olmasına rağmen parçalanmaya neden olmamıştır. Bu durum da bizi E kalıntısının tek başına yeterli olmadığı ve DE dipeptiti şeklinde parçalanmaya neden olacağını düşündürmektedir. Geçiş metalleri çoklu değerler alabilmektedir. Bu nedenle merkez atom gibi davranarak pek çok oksijen

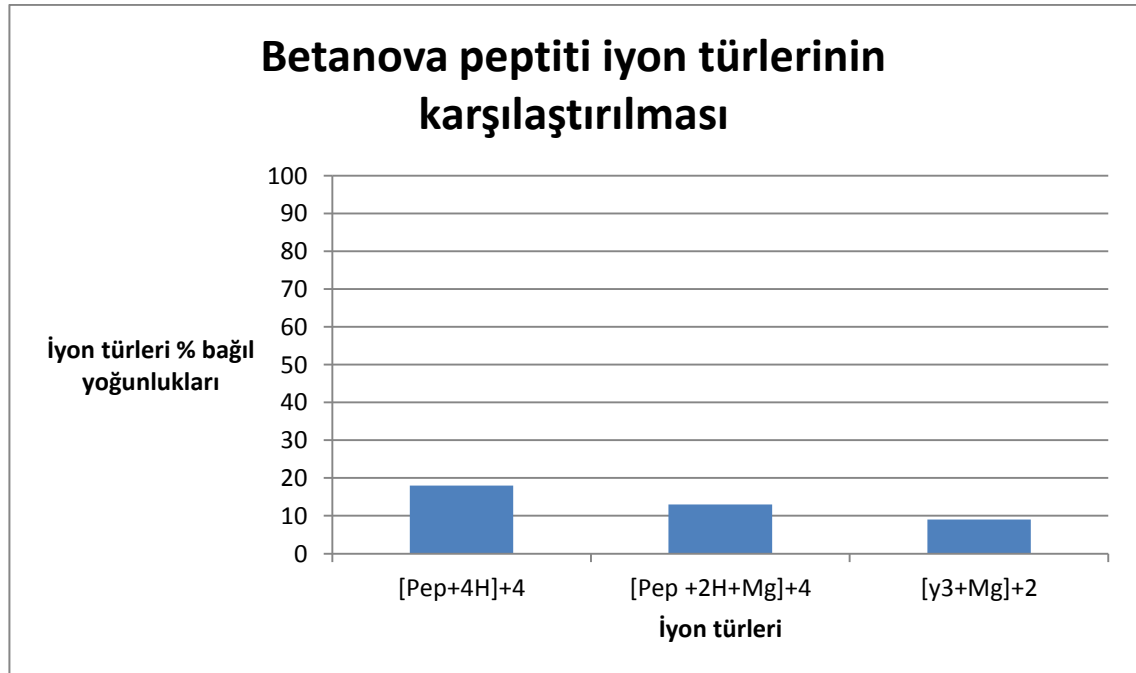
atomu ile etkileşebilirler. Ayrıca bir yerine iki adet metal merkezi bulunuyor olabilir. Burada peptidin ikincil yapısını oluşturan kuvvetlerin etkili olduğu düşünülmüştür.

Vpr peptitinde pek çok negatif yük oluşturacak aminoasit bulunduğundan, yapının çoklu etkileşimlerden dolayı parçalanmaya gitmediği düşünülmüştür. Burada peptidin çok dişli bir ligand gibi davrandığı söylenebilir. Yani bir şelatlanma söz konusudur.

Önerilen etkileşim;



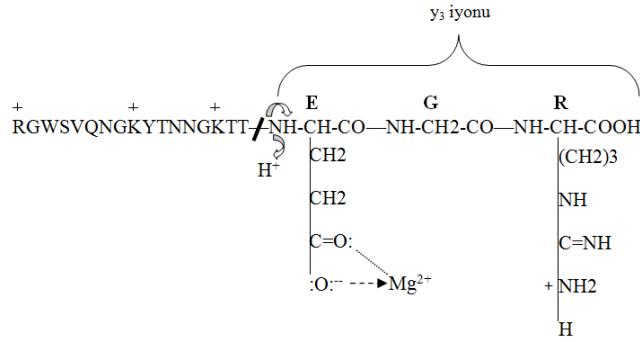
Şekil 5.4 Vpr peptit zincirinin katyonlarla etkileşimi



Şekil 5.5 Betanova peptiti iyon türlerinin karşılaştırılması

Mg kasyonu Ca kasyonuna benzer davranış göstermektedir. Betanova için $[Y_3+Mg]^+$ iyonları %9 bağıl yoğunlukta saptanmıştır. 2 adet E negatif yüklü aminoasit kalıntısı ile etkileşerek parçalanmaya neden olmuştur. Öngörülen parçalanma mekanizması;

Betanova:

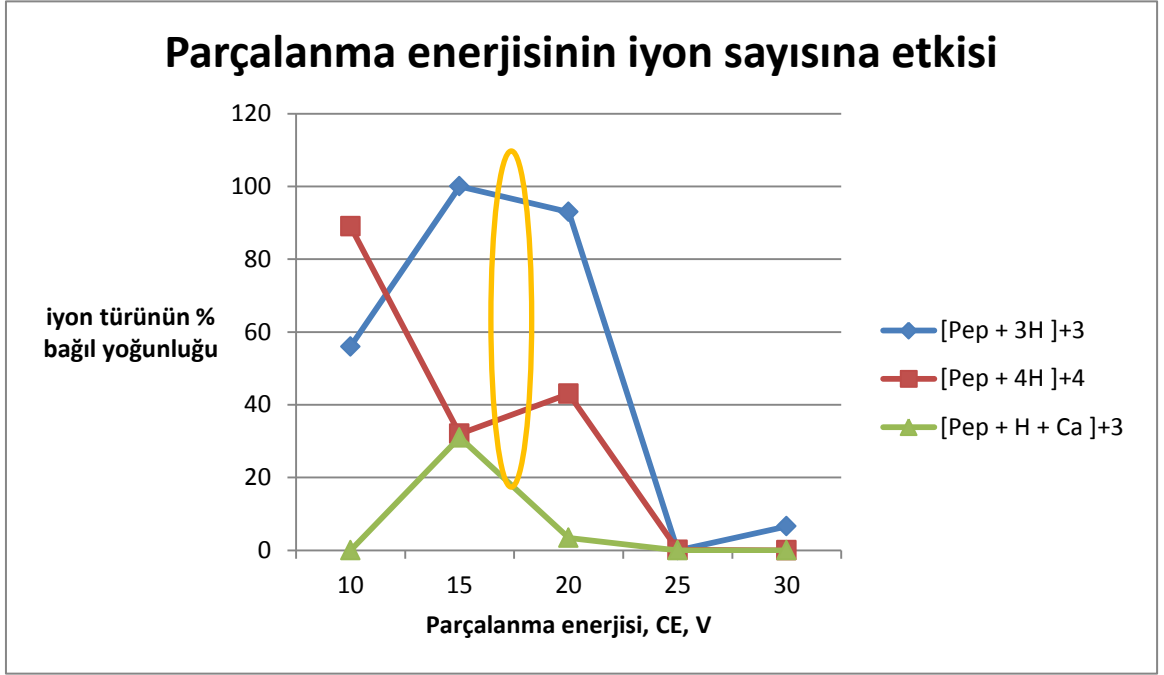


Şekil 5.6 Betanova peptidinin Mg^{2+} kasyonu ile etkileşimi

Şekildeki gösterim oldukça basitleştirilmiş bir gösterimdir. Tabiki +2 yüklü kation peptitle sadece bir yerden etkileşiyor olamaz. Peptit dizisindeki $-C=O$: karboksil yapılarındaki oksijenlerin valens e^- lerine de ilgi gösteriyor olabilir. Bu nedenle doğru bir mekanizma önermek çok zordur.

Cu, Co ve Fe kasyonları da peptitlere bağlanarak bir takım iyonik yapılar oluşturmuştur; fakat Ca ve Mg gibi sekans belirlemeye yardımcı olacak şekilde bir parçalanmaya yol açmamışlardır.

Oluşan tüm bu iyonların parçalanmasına neden olacak seviyede CE değerinin ayarlanması ya da farklı bileşenler eklenmesi ile metal-peptit iyon yapıları elde edilmeye çalışılabilir. Bu şekilde de sekansın bulunması için bir yol bulunabilir. Ayrıca farklı sekanslar kullanılarak sekans-metal ilişkisi için sınıflandırmalar yapılabilir.



Şekil 5.7 Parçalanma enerjisinin iyon sayısına etkisi

Şekil 5.7’de NPY peptiti için görülen iyonik yapıların parçalanma enerjisi değişimine göre değişen bağıl yoğunlukları görülmektedir. Bu grafik için 100:1 oranındaki metal:peptit çözeltisi seçilmiştir; çünkü tüm iyonların gözlenebilir olduğu bir çalışmadır ve bu nedenle iyonlar için karşılaştırma en iyi bu çalışmada gösterileceği düşünülmüştür. Sarı daire içerisinde kalan alan optimal koşulların sağlandığı alandır; çünkü her iyondan belli derecede vardır ve en önemlisi zemin gürültüsü en azdır. Bağıl yoğunluğu %20-100 arası değişen sinyaller görülmüştür. CE arttıkça da bu büyük moleküllü iyonların sayısı giderek azalmıştır; çünkü parçalanmışlardır. Büyük iyonun parçalanmasıyla da ortamda pek çok küçük iyon oluşarak spektrum yalınlığını kaybetmiştir. Ayrıca parçalanma enerjisi arttıkça küçük kütleli iyonlar çoğalacağından zemin gürültüsü artar ve spektrumu karmaşık hale getirir.

Vpr için grafik çizmek mümkün olmamıştır; çünkü metal bağılı peptit türü vermemiştir. Bazı iyon kümeleri oluşmuştur; fakat onların bağıl yüzdeleri çok düşüktür. Toplam iyon sayısı üzerinden parçalanma enerjisinin etkisi anlaşılmaya çalışılmıştır (çizelge 5.2).

Çizelge 5.2 Vpr peptiti için 100:1 metal:peptit oranında çeşitli parçalanma enerjilerinde ortamda bulunan toplam iyon sayıları

CE değeri	10-15	16-20	21-25	26-30
Na	1,383X10 ⁶	1,392X10 ⁶	2,235X10 ⁶	2,785X10 ⁶
K	1,113X10 ⁶	1,403X10 ⁶	1,764X10 ⁶	1,832X10 ⁶
Li	1,199X10 ⁶	1,489X10 ⁶	1,893X10 ⁶	2,144X10 ⁶
Cu	1,568X10 ⁶	1,603X10 ⁶	1,877X10 ⁶	2,112X10 ⁶
Ca	1,783X10 ⁶	1,783X10 ⁶	1,783X10 ⁶	1,783X10 ⁶
Co	1,307X10 ⁶	1,590X10 ⁶	1,775X10 ⁶	1,895X10 ⁶
Fe	1,185X10 ⁶	1,566X10 ⁶	1,812X10 ⁶	1,973X10 ⁶
Mg	1,066X10 ⁶	1,512X10 ⁶	1,906X10 ⁶	2,135X10 ⁶

Çizelge 5.2' ye göre parçalanma enerjisi ve iyon sayısı arasında doğru orantı olduğu gözlenmiştir.

Genel olarak, protonlanmış türler peptitlerin her çözeltisinde ortaya çıkmıştır. Bu durum çok çözeltinin pH'na da bağlıdır. Kullanılan nitrat tuzları çözeltinin asitliğini biraz arttırmaktadır.

İyon türlerinin yüzdeleri arasında ilişki kurmak çok zordur; çünkü Ca-bağlı herhangi bir türden kaynaklı olarak $[y_x+nH+mCa]$ türü ortaya çıkmış olabilir. Bunun yanı sıra parçalanma sırasında pek çok yapı kaybolmaktadır. Yani iyon niteliğini kaybederek spektrumda gözlenememektedir.

Gross ve Choi çalışmalarında tripeptit-heptapeptit kullanmışlardır ve y/b iyonlarına rastlamışlardır. Biz ise yüksek aminoasit sayılı peptitler kullandık. Bu nedenle sekonder yapıdan kaynaklı etkileşimler, metal bağlı yapıların fragmantasyona uğramasına engel olmuş olabilir. Kütle spektrumlarına bakarak sekonder yapının bozulup bozulmadığı hakkında yorum yapmak imkansızdır. Spektrumlar bize sadece kütleden yola çıkarak yorum yapmamıza yardımcı olurlar.

Peptitlerin metaller ile olan ilişkilerini incelemek kütle spektroskopisinde kullanılan en yeni yöntemlerden biridir. Burada en belirgin amaç, peptit sekansını saptayabilmektir. Böyle bir amacın başarıya kavuşması için yüzlerce çeşit sekans onlarca metal çözeltisinde farklı koşullar altında çalışmaya devam edilmelidir. Biz sadece 3 çeşit peptit ile asidik ortamda çalıştık. Ca katyonu için DE dipeptitinin önemi gösterdik ve peptitlerin sulu çözeltide bir ligand gibi davranabileceğini keşfettik.

Mg katyonu da belli bir bağıl yoğunlukta EE dipeptitinin bulunduğu amit bağından kırılma vermiştir. Bu çalışmanın da genel bir yargı olarak kalmaması için başka gruplarca çalışılmaya ihtiyacı vardır. Ayrıca ortamda kaybolan veya cihaz tarafından algılanılamayan pek çok tür vardır.

Kütle spektrometresi son teknolojilerle çok rahat kullanılabilen ve %100 güvenli sonuçlar veren bir analitik araç olmuştur. Bizim kullandığımız cihaz tipi çok yeni olmamakla beraber manuel ayarlama gerektirmiştir. Bu nedenle bir takım zorluklarla karşılaşmıştır. Fakat spektrumlar en ince ayrıntısına kadar incelenerek kütle hesaplamaları yapıp en doğru sonuçlara ulaşmak için gayret sarfedilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anbalagan, V. Patel, J. N. Niyakor, G. Van Stipdonk, M. J. 2003. Type rearrangement in the collision-induced dissociation of Li, Na and Ag cationized esters of N-acetylated peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 17(4):291-300
- Carlton Jr., D. D. Schug, K. A. 2011. A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 686, 19–39
- Christopher, K. Barlow, K. C. Mc Fadyen, D. W. O'Hair, R. A. J. 2005. Formation of cationic peptide radicals by gas-phase redox reactions with trivalent chromium, manganese, iron, and cobalt complexes. *J Am. Chem. Soc.* , 127 (16), 6109-6115
- Charles, L. Pe'pin, D. Gonnet, F. Tabet, J. C. 2001. Effects of liquid phase composition on salt cluster formation in positive ion mode electrospray mass spectrometry: Implications for clustering mechanism in electrospray. *J Am Soc Mass Spectrom*, 12, 1077–1084
- Choi, S. S. Song, M. J. 2009. Formation of $[nM-nH+(n+1)Na]^+$ cluster ions from amino acid by electrospray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry*, 285,126-130
- Chu, I. K. Shoeib, T. Guo, X. Rodriguez, C. F. Lau, T. C. Hopkinson, A. C. Siu, K. W. M. 2001. Characterization of the product ions from the collision-induced dissociation of argentinated peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 12, 163–175
- Cooper, T. J. Talaty, E. R. Van Stipdonk, M. J. 2005. Fragmentation pathway for CID of $(bn-1-Cat)^-$ Ions from model, metal cationized peptides. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16, 1305–1310
- Crizer, D. M. Mcluckey, S. A. 2009. Transition metal complex cations as reagents for gas-phase transformation of multiply deprotonated polypeptides . *J. Mass Spectrom*, 20, 1718-1722
- Gross, M. L. Nemirovskiy, O. V. 1998. Determination of calcium binding sites in gas-phase small peptides by tandem mass spectrometry . *J Am Soc Mass Spectrom*, 9, 1020–1028

- Gonzalez, J. Besada, V. Garay, H. Reyes, O. Padron, G. Tambara, Y. Takaot, T. Shimonishi, T. 1996. Effect of the position of a basic amino acid on C-terminal rearrangement of protonated peptides upon collision-induced dissociation. *Journal Of Mass Spectrometry*, 31, 150-158
- Harrison, A. G. Young, A. B. 2005. Fragmentation reactions of deprotonated peptides Containing proline: The proline effect. *J. Mass Spectrom.*, 40, 1173–1186
- Hao, C. March, R. E. Croley, T. R. Smith, J. C. Rafferty, S. P. 2001. Electrospray ionization tandem mass spectrometric study of salt cluster ions. Part 1— Investigations of alkali metal chloride and sodium salt cluster ions. *J. Mass Spectrom.*, 36, 79-96
- Hoffman, E. 2007. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, 4th Ed.
- Kebarle, P. Verkerk, U. H. 2005. Ion–ion and ion–molecule reactions at the surface of proteins produced by nanospray. Information on the number of acidic residues and control of the number of ionized acidic and basic residues. *J Am Soc Mass Spectrom*, 16, 1325-1341
- Li, H. Siu, K. W. M. Guevremont, R. Yves Le Blanct, J. C. 1997. Complexes of silver(I) with peptides and proteins as produced in electrospray mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 8, 781-792
- Loo, J. A. Hu, P. Smith, R. D. 1994. Interaction of angiotensin peptides and zinc metal ions probed by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am. Mass Spectrom.*, 5, 959-965
- Romanov, V. Siu, C. K. Verkerk, U. H. El Aribi, H. Hopkinson, A. C. Siu, K. W. M. 2008, Binding energies of the silver ion to alcohols and amides: A theoretical and experimental study. *J Phys. Chem. A*, 112 (43), 10912-10920
- Rodriquez, C. F. Guo, X. Shoeib, T. Hopkinson, A. C. Siu, K. W. M. 2000. Formation of $[M-nH+mNa]^{(m-n)+}$ and $[M-nH+mK]^{(m+n)+}$ ions in electrospray mass spectrometry of peptides and proteins . *J Am Soc Mass Spectrom*, 11, 967–975
- Smith, L. L. Wysocki, V. H. Tsaprailis, G Breci, L. A. 2000. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation . *J Mass Spectrom.*, 35, 1399–1406

- Unnithan, A. G. Myer, M. J. Veale, J. J. Danell, A. S. 2007. MS/MS of protonated polyproline peptides: The influence of N-terminal protonation on dissociation . *J Am Soc Mass Spectrom*, 18, 2198–2203
- Wang, J. Ke, K. Siu, K. W. M. Guevremont, R. 1996. Electrospray tandem mass spectrometry of alkali metal-containing anionic complexes of tripeptide . *Journal Of Mass Spectrometry*, 31, 159-168
- Wang, P. Polce, Bleiholder, M. J. C. Paizsb, B. Wesdemiotis, C. 2006. Structural characterization of peptides via tandem mass spectrometry of their dilithiated monocations. *International Journal of Mass Spectrometry*, 249–250, 45–59
- Wells, J.M. McLuckey, S. A. 2005. *Methods Enzymol.*, 402, 148-185
- Zhao, X. Morishetti, K. K. Russell, S. C. Robinson, D. B. Ren, J. 2011. Tandem mass spectrometry studies of protonated and alkali metalated peptoids: Enhanced sequence coverage by metal cation addition. *International Journal of Mass Spectrometry*, 308 ,98– 108
- Zhou, J. Shek, P. Y. I. Zhao, J. Ke, Y. Siu, K. W. M. Hopkinson A. C. 2006. Fragmentations of Protonated Arginine, Lysine and Their Methylated Derivatives: Concomitant Losses of Carbon Monoxide or Carbon Dioxide and an Amine. *J. Phys. Chem. A*, 110 (27), 8282-8296

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Filiz DOĞAN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 08.03.1985
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ayrancı YDAL (2003)
Lisans : Ankara üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2009)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (Şubat 2009, Ocak 2012)