

Výroční zpráva Ústavu analytické chemie AV ČR za rok 2006

I. Textová část

1. Vědecká činnost pracoviště a uplatnění jejích výsledků

a) *stručná charakteristika vědecké činnosti pracoviště*

Vědecká činnost Ústavu analytické chemie (UIACH) je orientována na výzkum a vývoj nových metod pro chemické analýzy. Velké nároky na rozvoj analytických metod klade prudký rozvoj v biologických vědách, především v genomice a proteomice, v oblasti medicíny, ochrany zdraví člověka, životního prostředí, bezpečnosti státu a v neposlední řadě i v oblasti boje s terorismem. Metodologický výzkum, vývoj instrumentace a metod na UIACH pokrývá oblasti separačních a spektroskopických technik, jmenovitě metody elektroforetické, mikrokolonovou kapalinovou chromatografii, elektrochromatografii, superkritickou chromatografii a extrakci, hmotnostně spektrometrické metody, atomovou absorpční, emisní a fluorescenční spektrometrii. Velká pozornost je věnována miniaturizaci instrumentace a nanotechnologiím.

Směry výzkumu jsou určeny Výzkumným záměrem Z 40310501 na léta 2005-2010 Moderní analytické techniky pro bioanalýzu, ekologii a nanotechnologie.

b) *několik nejdůležitějších výsledků vědecké činnosti a jejich aplikace*

Analýza životního prostředí:

Na základě matematického modelu jsme zhotovili různé konfigurace fokusačních aparatur pro vzorkování a zakoncentrování aerosolů a jejich následné vnášení do mikrovlnného plazmatu pro detekci jejich elementárního složení. Dokončili jsme konstrukci kontinuálního kolektoru frakcí aerosolu (CEFA - *Continuous electric aerosols focusing apparatus*) a zkonstruovali funkční zařízení pro fokusaci aerosolové frakce o velikosti částic 0,3 – 1 μm , pracující na principu *wire-to-cavity* uspořádání. (B)

Ověřili jsme možnosti „neelektrické“ fokusace pomocí virtuálního impaktoru, který bude sloužit jako pneumatický koncentrátor polydisperzního aerosolu před vstupem analyzovaných aerosolů do koncentrátoru pracujícího na principu elektrického *wire-to-cavity* uspořádání. (C)

V rámci spolupráce s firmou RS Dynamic jsme analyzovali a ověřili možnosti snížení detekčního limitu analyzátoru výbušnin (Explonix). Vyvinutý prototyp analyzátoru výbušnin umožňuje stanovení výbušnin s detekčním limitem pod 20 pikogramů, přičemž je minimalizována odezva na interferující látky. (C)

Bioanalytická instrumentace:

Studovali jsme enzymatické štěpení jako jednu z nejčastěji používaných jednotkových operací využívaných pro charakterizaci proteinů. V této práci jsme se zaměřili na vývoj systému pro analýzy extrémě malých množství vzorku v kapilárních, nebo mikrofluidických systémech. Studované enzymy byly nejprve imobilizovány na vnitřním povrchu křemenné kapiláry o průměru 10 μm a jejich aktivita testována v širokém rozsahu experimentálních podmínek. Následně byly optimalizované kapilární reaktory s vnitřním objemem jednotek nanolitru použity jako elektrosprejové špičky v nově vyvinutém rozhraní pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Tato instrumentace představuje alternativu k současným „off-line“ postupům proteinové analýzy a umožňuje provést analýzu zahrnující separaci, detekci, enzymatické štěpení a hmotnostně spektrometrické měření během několika minut. (B)

Byl vypracován systém spojení mikrofluidických jednotek pro přímé spojení s hmotnostní spektrometrií. Systém využívá externí miniaturizovaný nebulizátor s aerodynamickým transportem ionizovaných molekul. Na základě teoretického a experimentálního modelování byl připraven aerodynamický adaptér, který nahrazuje klasickou vstupní štěrbinu

hmotnostního spektrometru a umožňuje generovat stabilní elektrosprej přímo z výstupů mikrofluidických mikrokanálek bez nutnosti připojení standardních ESI špiček. (B)

Byla rozpracována metoda pro řízenou elektronickou desintegraci jednotlivých buněk na mikrofluidickém „chipu“. Během desintegračního procesu bylo využíváno průtoku jednotlivých buněk kvasinek *Rhodotorula glutinis* kolem mikroelektrod uvnitř 20 x 100 μm kanálku. Aplikací série vysokonapěťových pulzů bylo možno desintegrovat buněčnou membránu. Celý proces byl sledován monitorováním fluorescence DNA označené uvnitř buněk. (B)

Elektromigrační metody:

Studovali jsme vlastnosti elektroforetických rozhraní v systémech tvořených vícesytnými slabými elektrolyty, ve kterých neplatí Kohlrauschova regulační funkce a mohou vznikat zóny, jejichž vlastnosti nelze vysvětlit pomocí dosud známých principů. Byl vypracován nový teoretický model umožňující předpovídat vlastnosti zón a rozhraní v systémech, kde jsou vlastnosti nově vytvořené adjustované zóny funkcí vlastností obou původních zón, mezi kterými se nová zóna vytvořila. (B)

Byl vypracován optimalizovaný postup stanovení ethylglukuronidu (markeru konzumace alkoholu) v séru kapilární elektroforézou a aplikován na odhalení nedodržování léčebné kúry lidí, kteří propadli konzumaci alkoholu. Pomocí vyvinuté metody lze prokázat přítomnost ethylglukuronidu v séru i řadu hodin poté, kdy již ethanol v séru nelze zjistit. Metoda může být použita ve velmi širokém rozpětí koncentrací makrosložek, zejména acetátu a laktátu, jejichž koncentrace po konzumaci alkoholu rovněž narůstá. Dostatečná citlivost a klinická použitelnost byly testovány na analýzách vzorků dobrovolníků i reálných pacientů a výsledky byly korelovány s výsledky dalších markerů. (C)

Byl vyvinut postup pro stanovení disociačních konstant heteroarylaminoethanolů, které byly studovány jako možné nové léky s vasodilatační, β-adrenolytickou a antioxidační aktivitou. Navržená metoda pro tyto jednosytné slabé báze je založena na regresní analýze mobilitních křivek měřených ve vhodném rozsahu pH metodou kapilární zónové elektroforézy a vyžaduje velmi malá množství vzorku bez zvláštních požadavků na jeho čistotu. (B)

Byla vypracována citlivá a rychlá metoda izotachoforetického stanovení sladidel různé povahy v cukrovinkách a žvýkačkách. Současného stanovení iontových látek i látek cukerné povahy bylo docíleno přidávkem kyseliny borité ke vzorku. (C)

On-line kombinace izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy byla využita pro stopovou analýzu kationtových nečistot (sodíku, lithia a methylimidazolia) v iontových kapalinách na bázi butylmethylimidazolia. Zvolená technika s nepřímou detekcí v protiproudovém uspořádání s kontinuálním dávkováním vzorku umožnila dosáhnout detekční limity na úrovni 10 ppb pro methylimidazolium a 1 ppb pro lithium. (C)

Studovali jsme UV-spektra klastrových aniontů boru z hlediska jejich využití pro detekci při zónové elektroforéze. Zjistili jsme, že složitější klastry nemají v této oblasti dostatečné hodnoty extinkčních koeficientů a detekce je proto málo citlivá a značně omezuje přípustná složení základních elektrolytů. (B)

Separace v kapalné fázi:

Byl vyvinut původní postup pro přípravu vzorku a reprodukovatelnou separaci vybraných mikrobiálních kmenů a biopolymerů zónovou elektroforézou a isoelektrickou fokusací s fluorescenční detekcí v modifikované křemenné kapiláře. Byly dosaženy detekční limity řádu jednotek až desítek mikrobů za použití dynamické modifikace mikroorganismů neionogenním tenzidem na bázi pyrenu. Navržená metoda směřuje k rychlé identifikaci stop mikroorganismů bez potřeby jejich časově náročné kultivace. (B)

Byly syntetizovány monolitické silikagelové (sol-gel) i organopolymerní kapilární kolony. Kolony byly použity m.j. pro separaci hepatotoxických hexapeptidů mikrocystinů. Stanovení mikrocystinů má svoji důležitost pro vzrůstající výskyt sinic ve vodních nádržích. (B)

Byl vyvinut miniaturizovaný laserem indukovaný fluorescenční detektor, vhodný pro kapilární separační metody založený na světlovodných kapilárách. Detektor byl použit při elektroforetické separaci fluorescenčně značených aminokyselin a byla předvedena jeho aplikace při sledování dědičných metabolických poruch. (B) Nové fluorescenční nízkomolekulární standardy izoelektrického bodu (pI markery) byly použity pro kalibraci kyselých pH gradientů při izoelektrické fokusaci dynamicky modifikovaných/značených

mikroorganismů s fluorimetrickou detekcí. Markery byly využívány i v jiných projektech na ústavu i mimo ústav (B)

Stopová prvková analýza:

Vyvinuli jsme automatizovanou metodu speciální analýzy arsenu založenou na selektivním generování hydridů a kryoseparaci s detekcí atomovou absorpční spektrometrií (AAS), se zvláštním zřetelem na určení oxidačního čísla methylsubstituovaných sloučenin. Tuto metodu jsme pak zavedli na partnerském pracovišti (U.S. EPA), kde je využívána k analýze biologických vzorků (speciálně As v myších tkáních ve vztahu k diabetes 2 typu). (C) Na základě studia vlivu parametrů plamenových atomizátorů hydridů pro AAS jsme studovali interference organických s vodou mísitelných rozpouštědel na stanovení arsenu. Nalezení mechanismu těchto interferencí umožňuje potlačit jejich účinek volbou optimálního režimu atomizace. (B)

Pro prekoncentraci selenu a arsenu záchytem hydridů na křemenném povrchu a pro následnou atomizaci analytu a jeho detekci AAS jsme vyvinuli novou aparaturu. Stanovili jsme vliv relevantních experimentálních parametrů na účinnost záchytu a na účinnost volatilizace. Účinnost celého procesu se pohybuje kolem 70 % pro selen a kolem 50 % v případě arsenu. (B)

Pro prekoncentraci As, Bi, Sb a Se jsou také vyvíjena miniaturní kolekční zařízení na bázi grafitu a žáruvzdorných kovů.

Stanovili jsme rtuť ve vzorcích ryb z Divoké a Tiché Orlice. Obsah rtuti v rybách slouží jako bioindikátor stavu životního prostředí. (C)

Superkritická kapalinová extrakce a chromatografie:

Pokračovalo chromatografické studium dvoufázových systémů typu iontová kapalina - superkritický oxid uhličitý a studium solvatačních vlastností stlačené horké vody. V oblasti superkritické fluidní chromatografie jsme se zabývali přípravou dostatečně stabilních otevřených kapilárních kolon s iontovou kapalinou [tthdp][Cl] (chlorid trihexyltetradecylfosfonia) a jejich využitím k měření retenčních faktorů a distribučních konstant vybraných látek v systému [tthdp][Cl]-CO₂. Získané údaje byly použity k popisu mezifázové distribuce solutů v systému [tthdp][Cl]-CO₂ prostřednictvím molekulárních deskriptorů, přičemž jsme zaznamenali určité odlišnosti proti dřívějším výsledkům s imidazoliovými iontovými kapalinami (B).

V oblasti aplikací stlačené kapalně horké vody jako rozpouštědla jsme se soustředili na vývoj prediktivní korelace rozpustnosti polycyklických aromatických uhlovodíků jako funkce teploty a tlaku výlučně s využitím vlastností čistých složek a dále na měření vodných rozpustností tricyklických aromatických heterocyklických derivátů anthracenu a fluorenu (B).

Pozornost byla rovněž věnována vývoji reprodukovatelných technik přípravy monolitických kapilárních kolon pro HPLC a SFC na bázi SiO₂, zejména prvotnímu testování postupu založeného na hydrolýze alkoxyilanů (B).

Proteomika:

Pokračovali jsme v optimalizaci kombinace různých separačních a hmotnostně spektrometrických metod pro proteomickou identifikaci bílkovin. Pro identifikaci posttranslační modifikace proteinů byla vyvinuta nová proteomická technika bez nutnosti barvení gelů, vhodná právě pro separaci posttranslačně modifikovaných proteinů.

Byla dokončena dlouhodobá studie elučních mechanismů ve field-flow frakcionaci.

Největší pozornost byla věnována strukturní charakterizaci oligosacharidů pomocí různých hmotnostně spektrometrických metod. Využití negativního modu ukazuje velké možnosti při studiu struktury a vlastností oligosacharidů.

c) nejvýznamnější popularizační aktivity pracoviště

V květnu 2006 oslavil UIACH padesát let svého trvání. Oslava proběhla za přítomnosti předsedy a místopředsedy AV ČR prof. Pačese a prof. Drahoše a představitelů brněnského akademického i veřejného života. Jubilea se zúčastnil i zakladatel ústavu prof. Janák. K výročí ústavu přišlo též několik desítek blahopřání od současných i bývalých

spolupracovníků ústavu z celého světa. Výročí byl věnován i vydavatelský sloupec časopisu Chromatographia 9/10, o výročí i oslavě referoval článek v Akademickém Bulletinu 6/2006.

V rámci Týdne vědy a techniky přednesli pracovníci UIACH AV ČR tři přednášky pro odbornou veřejnost na UIACH a jednu pro laickou veřejnost v Literární kavárně knihkupectví Academia.

Dne otevřených dveří UIACH AV ČR, pořádaného dne 10.11.2006, se zúčastnilo celkem 34 návštěvníků, z toho 25 studentů 4. ročníku Střední průmyslové školy chemické v Brně, jejich 1 vyučující, 1 studentka 4. ročníku Biskupského gymnázia v Brně, 2 studenti Filosofické fakulty MU v Brně a 5 seniorů.

Do oblasti popularizačních aktivit spadaly i přednášky pracovníků UIACH v rámci vzdělávacího kursu Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek, (Ing. F. Foret, CSc.: Mikrofluidika a nanotechnologie pro proteomiku, 6.9.2006; Doc. RNDr. M. Roth, CSc.: Extrakce stlačenými tekutinami k přípravě organických vzorků pro analýzu, 7.9.2006), a v rámci vzdělávacího semináře Speciační analýza: principy a aplikace v životním prostředí a biomedicině (RNDr. J. Dědina, CSc.: Metody speciační analýzy založené na generování těkavých sloučenin, Mgr. Tomáš Matoušek, PhD.: Speciační analýza s využitím selektivního generování metylsubstituovaných arsanů a detektorem AAS). Tyto akce pořádalo Pražské analytické centrum inovací, Dr. Dědina byl také jedním z odborných garantů semináře. Ing. M. Nováková měla přednášku Využití kapilární izotachoforézy a kapilární elektroforézy pro stanovení mikrosložek ve vzorcích se složitou maticí v rámci kurzu pořádaného v Komorní Lhotce firmou 2THETA. V rámci vzdělávacího kurzu *ICP a AAS spektrometrie, elektroanalytické metody* pořádaného firmou 2THETA na Žermanické přehradě přednesl RNDr. J. Dědina, CSc. příspěvek Základní fyzikální principy AAS, Hydridová technika v AAS. V kurzu nazvaném *Kurz AAS II - pro pokročilé* pořádaném Spektroskopickou společností Jana Marka Marci v Praze přednášel RNDr. J. Dědina, CSc. téma Generování a atomizace hydridů pro AAS a AFS, Interference těkavých sloučenin, Specie hydridotvorných prvků. RNDr. B. Dočekal přispěl k programu kurzu přednáškami: Atomová absorpční spektrometrie s kontinuálním zdrojem záření,, Atomová absorpční spektrometrie s využitím laserových diod, Přímá analýza pevných vzorků AAS.

V prosinci oslavil 65 let prof. RNDr. Petr Boček, DrSc. Na počest tohoto výročí bylo publikováno speciální číslo časopisu ELECTROPHORESIS Vol. 27, sv. 23, editorem byla doc. RNDr. Ludmila Křivánková.

d) domácí a zahraniční ocenění zaměstnanců pracoviště

Ing. Josef Planeta, Ph.D. byl jedním z 28 mladých pracovníků AV ČR, kteří v roce 2006 získali prémii Otto Wichterleho. Ing. Jiří Šalplachta obdržel Cenu ministra zemědělství pro mladé vědecké pracovníky pro r. 2006 3. cenu za práci s názvem Identification of proteins by combination of size-exclusion chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time – off – flight mass spectrometry and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests. Ing. Karel Mazanec obdržel cenu děkana Fakulty chemické VUT za 1. místo v 9. ročníku soutěže prací studentů doktorských programů. Kolektiv Grym, Svobodová, Klepárník, Foret obdržel 2. cenu za Ph.D. poster na mezinárodní konferenci EDS, O6 IMAPS CS. RNDr. Mgr. J. Kratzer a Ing. P. Krejčí získali společně 1. cenu za nejlepší studentské přednášky na mezinárodní XVIII. Slovenské spektroskopické konferenci.

e) další specifické informace o pracovišti, změnách v jeho struktuře a vědecké orientaci, o výsledcích atestací a o překážkách a problémech v činnosti pracoviště

V listopadu bylo atestováno 17 pracovníků, z toho 8 pracovníků doporučila atestační komise v souladu s atestačními kritérii přeřadit do vyšších kvalifikačních stupňů.

2. Vědecká a pedagogická spolupráce pracoviště s vysokými školami

Jmenovité zhodnocení všech významných domácích spoluprací pracoviště s vysokými školami:

a) nejvýznamnější vědecké výsledky pracoviště vzniklé ve spolupráci s vysokými školami (kromě výsledků uvedených v bodě 2 b)

Část výsledků v oblasti vývoje a využití elektromigračních metod a stlačené kapalně horké vody, které uvádíme v bodě 1b), byla získána v rámci řešení projektu GA203/05/2106 Moderní instrumentace v chemické, potravinářské a klinické analýze (společný grant s Univerzitou Pardubice, řešitel prof. Vytrás, spoluřešitelka doc. Křivánková). Testování připravených kapilárních kolon probíhá v rámci neformálních spoluprací s Univerzitou Karlovou v Praze (doc. RNDr. Eva Tesařová, CSc., Katedra fyzikální a makromolekulární chemie PŘF UK, Albertov 6, 12843 Praha 2) a Masarykovou univerzitou v Brně (RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr., Ústav experimentální biologie PŘF MU, Kamenice 5, 62500 Brno).

Společně s Chemickou fakultou VUT Brno byla řešena část úkolů grantového projektu A400310613 Hmotnostní spektrometrický a elektroforetický výzkum klastrových sloučenin boru (řešitel Ing. J. Čáslavský, spoluřešitel doc. Ing. R. Vespalec, DrSc.) Nejvýznamnějším výsledkem této spolupráce je zjištění že Wrenův model interakce organických sloučenin s chirálními selektory neplatí pro interakce klastrových aniontů boru s α -cyklodextrinem ve vodně-metanolickém roztoku v důsledku odlišného mechanismu interakce.

V rámci společného projektu s pracovníky katedry analytické chemie PŘF UK v Praze jsme se věnovali prekoncentraci hydridotvorných prvků (FRVŠ 1011/2006/G6: Stanovení stopových koncentrací hydridotvorných prvků technikou HG-AAS a GAUK 306 /2006/B-CH/PrF: Vývoj a optimalizace křemenných prekoncentračních zařízení a atomizátorů pro ultrastopové stanovení hydridotvorných prvků metodou AAS) a řešili problematiku zachytu hydridů na křemenném povrchu (GA AV ČR A400310507: Speciační analýza atomovou fluorescenční a atomovou absorpční spektrometrií založená na generování hydridů). Výsledky jsou zahrnuty v bodu 1b.

Ve spolupráci s Veterinární a farmaceutickou univerzitou Brno bylo provedeno stanovení disociačních konstant, výsledek uveden v části 1b.

Ve spolupráci s LF MU v rámci řešení projektu AV A 4031302 Využití rychlé elektroforetické separace s velmi citlivou fluorimetrickou detekcí pro identifikaci mikroorganismů (řešitel Ing. M. Horká, CSc.) byla vyvinuta a aplikována metoda pro velmi citlivou fluorimetrickou detekci mikroorganismů separovaných kapilárními elektroforetickými metodami, což umožňuje jejich rychlou identifikaci, viz též 1b. Na řešení projektu se dále podílela Státní rostlinolékařská správa v Olomouci a Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany (SUJCHBO), detašované pracoviště Brno.

V rámci projektu A400310505 Elektrická fokusační předkoncentrace a kontinuální prvková analýza aerosolů atomovou emisní spektrometrií podporovaného GA AVČR jsme se spoluřešiteli z Ústavu fyzikálního inženýrství, FSI, VUT v Brně finalizovali konstrukci kontinuálního kolektoru frakcí aerosolu a zkonstruovali funkční zařízení pro fokusaci aerosolové frakce o velikosti částic 0,3 – 1 μ m, pracující na principu *wire-to-cavity* uspořádání.

b) nejvýznamnější výsledky činnosti výzkumných center a dalších společných pracovišť ústavu AV s vysokými školami

V rámci činnosti společného Centra základního výzkumu LC06023, na kterém se spolupodílí UIACH, Masarykova univerzita a Dětská nemocnice v Brně, byly rozpracovány nové metody pro aplikace mikrokolonových separací ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Výsledky jsou zmíněny v bodu 1b. Centrum se také spolupodílelo na organizaci mezinárodní konference CECE2006. V rámci činnosti centra proběhla též závěrečná stáž prof. Liushui Jana z univerzity v Nanchangu v Číně.

V rámci Výzkumného centra pro studium obsahových látek ječmene a chmele 1M6215648902 (MŠMT) byly separovány extrakty odrůd Jersey a Tolar pomocí 1D a 2D SDS PAGE. Obě odrůdy se vzájemně lišily pouze v koncentracích jednotlivých bílkovin. Větší rozdíly se projevíly v elektroforetickém profilu bílkovin mouky, sladu a piva. Žádné

změny nebyly pozorovány v bílkovinném složení piva a pěny. Posttranslační modifikace důležitých bílkovin ječmene byly sledovány metodou hmotnostní spektrometrie. Modifikace byly způsobeny glykacemi, ke kterým došlo po sladování ječmene.

V rámci plnění úkolu výzkumného centra 1M06030 Funkční genomika a proteomika ve šlechtění rostlin (MŠMT) byla provedena rešerše pro používání bioinformatických nástrojů při identifikaci bílkovin, aplikace různých proteomických přístupů k dosažení vysokého sekvenčního pokrytí bílkovin za použití hmotnostně-spektrometrické analýzy a optimalizace přípravy vzorku pro následnou hmotnostně-spektrometrickou analýzu (alkylace cysteinů v molekule bílkoviny před enzymatickým štěpením).

c) spolupráce s vysokými školami na uskutečňování doktorských studijních programů (DSP) a magisterského a bakalářského studia

UIACH má akreditaci pro doktorský studijní obor "Analytická chemie", který je uskutečňován s PřF UP v Olomouci, a pro obor "Chemie životního prostředí" s UCHTOŽP FCH VUT v Brně. Ústav má též uzavřenu smlouvu o spolupráci při uskutečňování doktorských studijních programů s Agronomickou fakultou MZLU v Brně. Spolupracujeme při výchově doktorandů s FaF VFU v Brně, Univerzitou Pardubice a VŠCHT Praha.

Řada zaměstnanců je členy oborových rad a komisí pro státní doktorské zkoušky a obhajoby doktorských disertačních prací (dr. D. J. Dědina na PřF UK; dr. Chmelík na MZLU v Brně, doc. Křivánková, doc. Roth, dr. Chmelík na PřF UP v Olomouci; doc. Křivánková, Ing. Foret, doc. Roth, doc. Šlais na PřF MU v Brně; doc. Dočekal, doc. Křivánková, dr. Kahle, Ing. Večeřa na UCHTOŽP FCH VUT v Brně).

Zaměstnanci přednášejí na řadě univerzit a vysokých škol v ČR i v zahraničí: PřF UK – dr. Dědina; FJFI ČVUT – dr. Vobecký; FCHI VŠCHT Praha – doc. Dočekal, Ing. Večeřa; Univerzita Pardubice – Ing. Foret, doc. Křivánková; FaF VFU Brno - doc. Vespalec. doc. Dočekal organizoval semestrální cyklus přednášek pro doktorandy na UCHTOŽP FCH VUT, přednášející byli z UIACH.

Ing. Foret je členem zkušební komise PhD studentů na Univerzitě v Lundu (Švédsko) a San Pablo-CEU University v Madridu (Španělsko). Dr. Chmelík je členem zkušební komise PhD studentů na Univerzitě v Grenoble (Francie) a na Technické univerzitě ve Vídni (Rakousko). Dr. Dědina oponoval PhD práci obhajovanou na Tschwane University, Pretorie, JAR.

3. Spolupráce pracoviště s dalšími institucemi a s podnikatelskou sférou

Jmenovité zhodnocení spolupráce s dalšími mimovysokoškolskými výzkumnými a mimoakademickými pracovišti:

a) společné projekty výzkumu a vývoje podpořené z veřejných prostředků:

Část výsledků v oblasti analytických extrakcí stlačenými tekutinami v rámci řešení výzkumného záměru UIACH AV ČR (AV0Z40310501) byla získána ve spolupráci s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s.

V rámci společného projektu s pracovníky Státního zdravotního ústavu v Praze (IGA MZ - NR/8953 - 3/2006 „Rtuť a metylrtuť ve vlasech vybrané populace v ČR jako bioindikátor expozice rtuti“) jsme optimalizovali podmínky pro přípravu radioindikátorů rtuti a pro experimenty s nimi. Kromě toho jsme analyzovali vzorky srsti zvířat a stanovili poměr anorganicky vázané rtuti a metylrtuťnatých sloučenin.

Projekt MZ NAZV 1B 53002 Hodnocení bezpečnosti potravin pro bezlepkovou dietu byl řešen ve spolupráci s Výzkumným ústavem potravinářským v Praze. V letošním roce bylo provedeno sledování biologické aktivity peptidů získaných z gliadinu působením různých enzymů. Pro enzymatické štěpení byly použity tři sady frakcí z gelové chromatografie, které byly po redukci dithiothreitem naštípány pepsinem a prolin specifickou endoproteázou.

b) výsledky výzkumu a vývoje pro ekonomickou sféru (případně dosažené ve spolupráci s touto sférou) na základě hospodářských smluv

V rámci spolupráce (EUREKA E! 3109) s firmou RS Dynamic (Starochodovská 1359/76, Praha 4) jsme se podíleli na vývoji nového detektoru výbušnin (Explonix). Vyvinuli jsme prototyp přístroje, který umožňuje stanovení výbušnin s detekčním limitem pod 20 pikogramů, přičemž je desetibilionkrát potlačena odezva na interferující látky.

Pro firmu Contipro byly charakterizovány rozdíly mezi enzymaticky a kysele štípanou kyselinou hyaluronovou.

Byla uzavřena smlouva s CHF VUT Brno pro Beckton – Dickinson (BD), USA na testování a vývoj pl markerů pro free flow elektroforézu.

d) odborné expertizy zpracované v písemné formě pro státní orgány a instituce

Kromě odborných expertiz vypracovaných pro státní orgány, kterých bylo v roce celkem 28, zaměstnanci ústavu vypracovávají posudky prací zaslaných do významných mezinárodních časopisů, především Electrophoresis, Journal of Chromatography, Journal of Separation Science, Analytical Chemistry, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Journal of Mass Spectrometry, Spectrochimica Acta Part B a Talanta, Current Analytical Chemistry, Analytical and Bioanalytical Chemistry Brazilian Journal of Analytical Chemistry, Journal of Physical Chemistry B.

4. Mezinárodní vědecká spolupráce pracoviště

Informace o významných mezinárodních vědeckých spolupracích pracoviště:

a) přehled mezinárodních projektů, které pracoviště řeší v rámci mezinárodních vědeckých programů

Účastnili jsme se dvou mezinárodních projektů:

Zastřešující organizace: MŠMT, název programu: KONTAKT, název projektu: Investigation of the barley grain proteome and glycome by means of low and high CID and the impact on quality of barley

Zastřešující organizace: "Fogarty International Center" a "National Institute of Environmental Health Sciences". Název programu: "Fogarty International Research Collaboration Award". Název projektu: "Optimized Hydride Generation Systems for Arsenic Speciation Analysis".

b) nejvýznamnější vědecké výsledky dosažené v rámci mezinárodní spolupráce;

Ve spolupráci s Department of Analytical Chemistry, University of Helsinki, Finland (Dr. T. Hyötyläinen) byly vyvinuty nové aplikace úplné dvourozměrné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (2D-HPLC/MS) k analýze kyselých složek atmosférických aerosolů a glykosidů rostliny *Stevia rebaudiana* Bertoni, využívaných jako přírodní alternativní sladidla.

Ve spolupráci s Institutem klinické farmakologie, Universita Bern, Švýcarsko, byla vyvinuta metoda stanovení ethylglukoronidu v séru, viz bod 1b.

Ve spolupráci s Laboratoire d'Electrochimie et Chimie Analytique, Paříž, Francie byla vypracována technika ke stanovení nečistot v iontových kapalinách, viz bod 1b).

Výsledky spolupráce s Department of Nutrition, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA a s U. S. EPA, Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A. v rámci výše uvedeného projektu "Optimized Hydride Generation Systems for Arsenic Speciation Analysis" jsou zahrnuty v bodu 1b.

Ve spolupráci s Department of Analytical Chemistry, Technical University ve Vídni (Rakousko) byl studován vliv experimentálních podmínek na fragmentace peptidů.

c) *akce s mezinárodní účastí, které pracoviště organizovalo nebo v nich vystupovalo jako spolupořadatel*

Ve dnech 13. a 14. listopadu 2006 proběhlo v přednáškovém sále UIACH třetí multidisciplinární setkání CECE06. Na programu setkání bylo 16 zvaných přednášek významných pracovníků z různých oborů moderní bioanalýzy. Setkání se zúčastnilo přes 60 účastníků, z toho 15 zahraničních.

d) *výčet jmen nejvýznamnějších zahraničních vědců, kteří navštívili pracoviště AV ČR (přední badatelé v daném oboru, nositelé významných mezinárodních ocenění apod.).*

Prof. Edgar Arriaga, University of Minnesota, USA, Prof. G. CH. H. Frank, University of Bayreuth, SRN, Prof. Milos Novotny, Bloomington University, USA, Prof. Marja-Liisa Riekkola, University of Helsinki, Finsko, Dr. Dirk Janasek, ISAS, Dortmund, SRN, Dr. Miroslav Macka, Dublin City University, Dublin, Irsko, Prof. Ernst Kenndler, University of Vienna, Rakousko, Prof. M. Lämmerhofer, University of Vienna, Rakousko, Dr. Robert Mistrik, HighChem, Ltd., Bratislava, Slovensko, Prof. A. Guttman, Univ. Innsbruck, Rakousko, Prof. Andreas Rizzi, University of Vienna, Rakousko, Dr. Miroslav Stýblo, University of North Carolina at Chapel Hill, USA.

Příloha k Výroční zprávě Ústavu analytické chemie AV ČR za rok 2006

1) Anotace

I.

Studium elučních mechanismů ve field-flow frakcionaci - nové možnosti charakterizace částic pomocí gravitační field-flow frakcionace

Josef Chmelík a Jana Plocková

Byla dokončena dlouhodobá studie elučních mechanismů ve field-flow frakcionaci. Nejprve byly teoreticky navrženy (1) a po té experimentálně ověřeny (2) nové možnosti programování silového pole v gravitační field-flow frakcionaci založené jednak na gradientech průtoku nosné kapaliny vyvolaných změnou průtoku (3) nebo tvaru separačního kanálu (4), jednak na hustotních a viskozitních gradientech složení nosné kapaliny (5). Vyvinuté gradientové eluční techniky byly využity pro separaci silikagelových částic a škrobových zrn (6). Při těchto experimentech se podařilo zvýšit rozlišení separovaných látek a zkrátit dobu analýzy oproti isokratické separaci (2-5). Tyto nové eluční techniky výrazně rozšiřují separační potenciál GFFF na separace komplexních částic včetně živých buněk.

Investigation of elution mechanisms in field-flow fractionation - new ways of characterization of particles by using gravitational field-flow fractionation

Josef Chmelík a Jana Plocková

New ways of force field programming in gravitational field-flow fractionation were described theoretically (1) and then they were verified experimentally (2). They are based on utilization of gradients of the flow velocity of the carrier liquid induced either by differential pumping (3) or non-constant cross-sections of separation channels (4) and on density and viscosity gradients in composition of carrier liquids (5). The new elution techniques were used for separation of silica gel particles and starch granules (6). They enabled both to increase the resolution of separated particles and to shorten analysis times in comparison to isocratic elution (2-5). These new elution techniques increase substantially the separation potential of GFFF in the area of separation of complex mixtures including living cells.

(1) Chmelík, J.: *Different elution modes and field-programming in gravitational field - flow fractionation. I. A theoretical approach.* – Journal of Chromatography A 845: 285 - 291 (1999)

(2) Plocková, J., Chmelík, J.: *Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation. II. Experimental verification of the range of conditions for flow-rate and carrier liquid density programming.* – Journal of Chromatography A 868: 217-227 (2000)

(3) Plocková, J., Chmelík, J.: *Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation. III. Field programming by flow-rate gradient generated by a programmable pump.* – Journal of Chromatography A 918: 361 - 370 (2001)

(4) Plocková, J., Matulík, F., Chmelík, J.: *Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation. IV. Field programming achieved with channels of non-constant cross-sections.* – Journal of Chromatography A 955: 95-103 (2002)

(5) Plockova, J., Chmelik, J.: *Different elution modes and field programming in gravitational field-flow fractionation. V. Field programming using density and viscosity gradients.* – Journal of Chromatography A 1118: 253-260 (2006)

(6) Chmelík, J., Mazanec, K., Boháčenko, I., Psota, V.: *Relationship between the ratio of large and small starch granules determined by gravitational field-flow fractionation and malting quality of barley varieties.* – Journal of Liquid Chromatography, submitted

úpravy anglického textu je možno konzultovať s RNDr. Josefem Chmelíkem, CSc.

CE/MS interface with open tubular enzymatic reactor electrospray needle for on-line analysis of proteins.

Křenková J., Klepárník K., Kusý, P., Foret F.

Enzymatické štěpení je jedna z nejčastěji používaných jednotkových operací využívaných pro charakterizaci proteinů. Nejčastěji je prováděno v homogenním roztoku a to i přes značná omezení vztahující se ke složitosti, objemu a rychlosti reakce. Významného zlepšení lze docílit s využitím enzymů imobilizovaných na pevném nosiči, například na částicových, nebo monolitických kolonách. Pro analýzy extrémně malých množství vzorku v kapilárních, nebo mikrofluidických systémech je možné imobilizovat enzym přímo na povrchu mikrokanálku, kterým vzorek prochází. V této práci byly enzymy nejprve imobilizovány na vnitřním povrchu křemenné kapiláry o průměru 10 μm a jejich aktivita testována v širokém rozsahu experimentálních podmínek. Následně byly optimalizované kapilární reaktory s vnitřním objemem jednotek nanolitřů použity jako elektrosprejové špičky v nově vyvinutém rozhraní pro spojení kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrií. Tato instrumentace je vyvíjena jako alternativa k současným "off-line" postupům proteinové analýzy. V principu je tímto způsobem možné provést analýzu zahrnující separaci, detekci, enzymatické štěpení a hmotnostně spektrometrické měření během několika minut.

CE/MS interface with open tubular enzymatic reactor electrospray needle for on-line analysis of proteins.

Křenková J., Klepárník K., Kusý, P., Foret F.

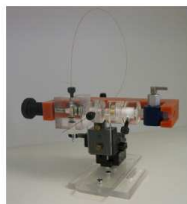
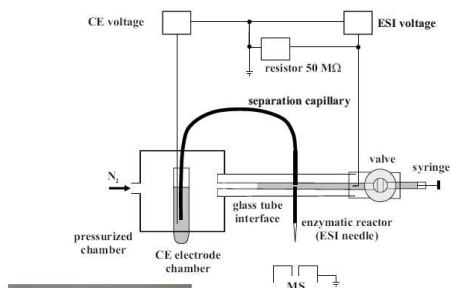
Enzymatic cleavage is one of the most frequently performed unit operations involved in a typical analytical flow path in the protein analysis. In spite of practical limitations (e.g. speed, volume, complex sample handling) the digestion is typically performed in a homogeneous liquid phase. Significant improvements can be achieved by using enzymes immobilized on a solid support such as beads or monolithic columns. Ultimately, for extremely small sample volumes, e.g., in capillary or microfluidic systems, the enzyme can be immobilized directly on the wall of the microchannels. In this work enzymes were covalently immobilized inside a 10 μm ID fused-silica capillary and the proteolytic activity was characterized in wide range of conditions. The optimized open tubular reactor was then used as the nanospray needle in the newly developed liquid junction based interface for capillary electrophoresis/mass spectrometry coupling. The resulting instrumentation is being developed as an alternative approach to common off line methods for protein analysis. In principle, such an analysis, where the sample is on-line separated, detected, digested and analyzed by mass spectrometry, can be performed in just a few minutes.

Křenková, J., Klepárník, K., Foret, F.: *Mass spectrometry coupling with immobilized enzyme electrospray capillaries.* – Journal of Chromatography, zasláno – pozvaný příspěvek (2007)

Kusý, P., Klepárník, P., Aturki, Z., Fanali, S., Foret, F.: *Optimization of pressurized liquid junction nanoelectrospray interface between capillary electrophoresis and mass spectrometry for reliable proteomic analysis.* - Electrophoresis 27: 4666-4673 (2006)

Fanali, S., D'Orazio, G., Foret, F., Klepárník, K., Aturki, Z. : *On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface coated capillaries.* - Electrophoresis 27: 4666-4673 (2006)

LIQUID JUNCTION INTERFACE

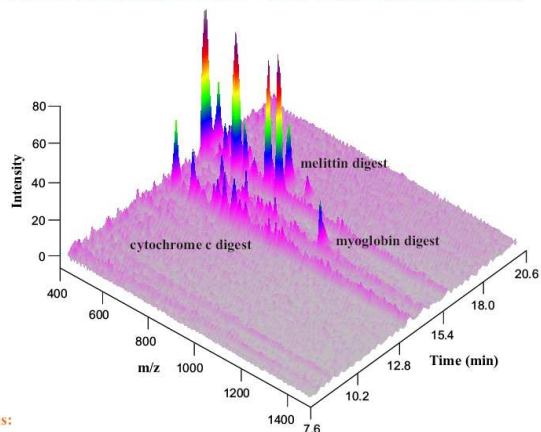


MASS SPECTROMETRY

MS analysis
Mariner mass spectrometer
(ESI-oTOF-MS, ABI, USA)
on-line CZE-digestion-ESI/TOF MS

MS/MS analysis
Esquire HCT
(ESI-IT-MS, Bruker Daltonics, Germany)

CZE - PEPSIN A DIGESTION - ESI/TOF MS ANALYSIS



Conditions:

Sample: 6.25 µg/ml of cytochrome c and myoglobin, 3.3 µg/ml of melittin

CZE: 50 cm PVA-coated capillary (75 µm ID, 365 µm OD) MS: 30 cm pepsin A reactor (10 µm ID, 365 µm OD)
BGE: 1% formic acid spray and digestion liquid: 1% formic acid
separation voltage: 10 kV spray voltage: 2.5 kV (positive mode)
electrokinetic injection: 5 s pressure: 200 kPa

úpravy anglického textu je možno konzultovať s Ing. Františkom Foretem, CSc.

Stanovení ethylglukuronidu v séru kapilární zónovou elektroforézou

Křivánková, L., Mrázková, M., Gebauer, P.:

Byla vypracována velmi citlivá metoda elektroforetického stanovení ethylglukuronidu v lidském séru. Ethylglukuronid je metabolit etanolu, který lze zjistit v séru řadu hodin až dní po konzumaci alkoholu. Metoda je jednoduchá, nevyžaduje žádnou předúpravu vzorků a využívá přítomnosti přirozených makrosložek séra k vyvolání efektů přechodné izotachofórézy v zónové elektroforéze ke zvýšení citlivosti analýz. Eliminuje současně negativní efekty dalších přirozených složek séra, laktátu a acetátu, jejichž obsah se také po požití alkoholu značně zvyšuje, ale jejichž celkový obsah je nespecifický. Metoda je robustní, může být použita ve velmi širokém rozpětí koncentrací přítomných makrosložek. Dostatečná citlivost a klinická použitelnost byly testovány na analýzách vzorků séra dobrovolníků i reálných pacientů. Ve vzorcích pacientů léčených ze závislosti na alkoholu byly pomocí elektroforetických analýz ethylglukuronidu a karbohydrátdeficientního transferrinu jednoznačně odhaleny případy nedodržování léčebného režimu a abstinence.

Determination of ethylglucuronide in serum by capillary zone electrophoresis

Křivánková, L., Mrázková, M., Gebauer, P.:

A very sensitive method of determination of ethylglucuronide in human serum was elaborated. Ethylglucuronide is a marker of ethanol consumption that can be found in serum for a number of hours to days after alcohol intake. The method is simple, does not need any sample pretreatment and uses natural serum macrocomponents to cause the effect of transient isotachophoresis in zone electrophoresis to increase the sensitivity of the analyses. It simultaneously eliminates negative effects of other natural serum components, lactate and acetate, the contents of which also increases after alcohol consumption while their total contents is non-specific. The method is robust and can be used in a very broad range of concentrations of present macrocomponents. Sufficient sensitivity and clinical applicability were tested on analyses of serum samples from both volunteers and real patients. Electrophoretic analyses of ethylglucuronide and carbohydrate deficiency transferrin of samples from patients treated for alcohol addiction unambiguously revealed cases of not following the treatment regime and abstinence.

(1) Křivánková, L., Caslavská, J., Malášková, H., Gebauer, P., Thormann, W.: *Analysis of ethyl glucuronide in human serum by capillary electrophoresis with sample self-stacking and indirect detection.* - *Journal of Chromatography A* 1081: 2-8 (2005)

(2) Mrázková, M., Caslavská, J., Thormann, W., Křivánková, L.: *Effects of lactate and acetate on the determination of serum ethyl glucuronide by CZE.* - *Electrophoresis* 27: 4772-4778 (2006)

úpravy anglického textu je možno konzultovat s RNDr. Petrem Gebauerem, CSc.

2) seznam knižních publikací vydaných na pracovišti

Byla vydána brožurka k 50. výročí vzniku UIACH: Ústav analytické chemie Akademie věd České republiky 1956-2006. Historie, současnost a perspektivy. 12 stran (tiskárna DaL Tisk)
 Jako každoročně jsme vytiskli Seznam prací. List of Papers. 2005. 53 stran

II) Tabulková část

Vědečtí pracovníci, DSP, spolupráce s VS

(část IIA. výroční zprávy vědeckých pracovišť AV ČR za rok 2006)

Identifikační číslo organizace (IC)	68084715
Zkrácený název pracoviště	UIACH AV ČR

1)	Forma vědeckého vzdělávání	počet absolventů v r. 2006	počet doktorandů k 31.12. 2006	počet nově přijatých v r. 2006
	doktorandi (studenti DSP) v prezenční formě studia	0	22	6
	doktorandi (studenti DSP) v kombinované a distanční formě studia	1	9	3
	C e l k e m	1	31	9
	- z toho počet doktorandů ze zahraničí	0	0	0

2)	Forma výchovy studentů pregraduálního studia	
	celkový počet diplomantů	11
	počet pregraduálních studentů podílejících se na vědecké činnosti ústavu	7

3)	Vědecké a vědecko-pedagogické hodnosti pracovníků ústavu	věd. hodnost nebo titul		vědecko-pedagog. hodnost	
		DrSc., D.Sc.	C.Sc., PhD	profesor	docent
	počet k 31. 12. 2006	3	25	1	5
	z toho uděleno v roce 2006				

4)	Pedagogická činnost pracovníků ústavu	letní semestr 2005/06	zimní semestr 2006/07
	Celkový počet odpřednášených hodin na VŠ	30	68
	Počet semestrálních cyklů přednášek, seminářů a cvičení	3	3
	Počet pracovníků ústavu pedagogicky působících na VŠ	5	5

Vědečtí pracovníci, DSP, spolupráce s VS

(část IIA výroční zprávy vědeckých pracovišť AV ČR za rok 2006)

pokračování 1

5)	Spolupráce ústavu s VŠ ve výzkumu	pracoviště AV příjemcem	pracoviště AV spolupříjemcem
	Počet projektů a grantů, řešených v r.2006 společně s VŠ (včetně grantů GA ČR a GA AV)	15	8
	Počet pracovníků VŠ, kteří mají v ústavu vedlejší pracovní úvazek	0	
	Počet pracovníků ústavu, kteří mají na VŠ vedlejší pracovní úvazek	2	

Vědeckí pracovníci, DSP, spolupráce s VŠ

(část IIA výroční zprávy vědeckých pracovišť AV ČR za rok 2006)

pokračování 2

6) Společná pracoviště ústavu s účastí VŠ

Název spol. pracoviště	Počet pracovníků	
	fyz. p. d.	prům. přep.

Mezinárodní vědecká spolupráce pracoviště

(část IIB. výroční zprávy vědeckých pracovišť AV ČR za rok 2006)

Identifikační číslo organizace (IČ)	68081715
Zkrácený název pracoviště	UIACH AV ČR

1. Počet konferencí s účastí zahraničních vědců (pracoviště jako pořadatel nebo spolupořadatel)	1
2. Počet zahraničních cest vědeckých pracovníků ústavu	50
2a/ z toho mimo rámec dvoustranných dohod AV ČR	48
3. Počet aktivních účastí pracovníků ústavu na mezinárodních konferencích	45
3a/ Počet přednášek přednesených na těchto konferencích	29
3b/ z toho z v a n ě přednášky	8
3c/ Počet posterů	68
4. Počet přednášejících na zahraničních univerzitách	1
5. Počet členství v redakčních radách mezinárodních časopisů	11
6. Počet členství v orgánech mezinárodních vědeckých vládních a nevládních organizací (společnosti, komitety)	3
7. Počet přednášek zahraničních hostů v ústavu	14
8. Počet grantů a projektů financovaných ze zahraničí	2
8a/ z toho z programů EU	

Počty udělených patentů, užitných vzorů, přihlášených vynálezů a platných licenčních smluv v AV ČR v roce 2006

(část IIC. výroční zprávy vědeckých pracovišť AV ČR za rok 2006)

Identifikační číslo organizace (IČ):	68081715
Zkrácený název pracoviště:	UIACH AV ČR

1. Patenty udělené v ČR	0
1a. v zahraničí	0
2. Zapsané užitné vzory	0
3. Přihlášky vynálezů	0
4. Přihlášky užitných vzorů	0
5. Platné licenční smlouvy celkem	0
5a. z toho uzavřené v roce 2006	0