

Výroční zpráva Ústavu analytické chemie AV ČR za rok 1997

1. Vědecká činnost pracoviště a uplatnění jejích výsledků

a) Kromě "tradičních" oblastí vývoje a aplikace separačních a spektrálních metod analytické chemie, v nichž aktivita ústavu navazovala na program předchozích let, se v roce 1997 rozsah činnosti ústavu rozšířil o využití hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro charakterizaci vysokomolekulárních látek.

b) Nejvýznamnější výsledky dosažené v jednotlivých oblastech činnosti ústavu jsou:

Oblast separace, charakterizace a mikropreparace biopolymerů a částic

Byly zkoumány separační mechanismy vedoucí k vysoce selektivním a rychlým analýzám fragmentů genomové DNA. Experimentálně prokázaná vysoká selektivita separace na rozhraní separačního média s volným roztokem vzorku umožnila separovat polyelektrolyty na velmi krátké dráze během několika desítek sekund. Ve srovnání s komerčními sekvenátory poskytlo zařízení vlastní konstrukce dvojnásobnou délku čtení sekvence za čtyřnásobně kratší čas (**B**). Ultrarychlé separace na kapiláře byly ukázány na analýze mikrosatelitních dinukleotidových repeticí (CA) v intronu 5 genu pro FcERI β , vysoce afinitního receptoru pro IgE lokalizovaného na chromozomu 11. Fragmenty DNA z PCR amplifikace na zmíněném intronu byly analyzovány rychlostí až o dva řády vyšší než vykazuje standardní desková elektroforéza (**B**). Byly studovány změny a možnosti programování silového pole v gravitační field-flow frakcionaci (GFFF) a byla vypracována metoda izolace škrobových zrn z ječmene pro účely studia v GFFF (**C**). V oblasti hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF bylo provedeno počáteční testování různých matic pro ionizaci vzorku a bylo testováno spojení MALDI-TOF se superkritickou fluidní chromatografií (SFC) k charakterizaci polydimethylsiloxanů (**B**).

Oblast teorie a metodologie elektromigračních metod

V rámci snahy zlepšit citlivost a selektivitu kapilární zónové elektroforézy (CZE) byl vyvinut matematický model umožňující mj. odlišit systémové píky od píků nepřímé detekce. Dokončení jednoduché teorie vysvětlující systémovou zónu jako migrující vakanci v koncentraci některé složky základního elektrolytu znamená průlom v pochopení celé řady efektů pozorovaných při analýzách pomocí CZE (**B**). Na základě studia přechodu izotachoforetické migrace na migraci zónové elektroforetickou byla stanovena pravidla optimalizace elektrolytových systémů a pracovních podmínek k dosažení maximálního koncentrujícího efektu izotachoforézy (ITP) a potřebného rozlišení analytu a maximální citlivosti detekce v CZE kroku. Experimentálně bylo ověřeno, že kombinace ITP-CZE dává spolehlivé výsledky bez ohledu na proměnlivost matrice a umožňuje dávkování velkých objemů vzorků biologického původu bez jakékoli předúpravy (**B**). Vývoj barevných markerů pro kapilární izoelektrickou fokusaci (IEF) si vyžádal studium intramolekulárních vodíkových můstků a jejich vlivu na acidobazické vlastnosti molekul v řadě vhodně syntetizovaných aminomethylderivátů nitrofenolů (**B**). Teoreticky i experimentálně byla ověřena izotachoforetická fokusace silných a slabých elektrolytů v kontinuálním gradientu vodivosti (**B**). Pro stanovení mono- a disacharidů CZE byla vyvinuta metoda nepřímé detekce ve viditelné oblasti (400 nm) využívající chromoforu (*p*-nitrofenol) v nosném elektrolytu, která má řadu možných aplikací (**C**).

Oblast kapalinové chromatografie

Byl ukázán vliv množství dávkované retenční kapaliny a rozměrů kapiláry na faktor obohacení při fokusaci analytu založené na dvoufázovém toku v kapilární kapalinové chromatografii (**B**).

Oblast stopové prvkové analýzy

Byl stanoven (i) vliv relevantních experimentálních parametrů na účinnost *in-situ* kolekce v podélně vyhřívaném grafitovém atomizátoru a na interference při přímé atomizaci hydridu v příčně vyhřívaném atomizátoru a (ii) mechanismus působení molekulárního kyslíku na osud volných atomů (**B**). Pro speciaci arzenu v tělních tekutinách bylo testováno několik přístupů k mineralizaci jednotlivých forem arzenu. Kromě toho bylo zjištěno, že pro stanovení arzenu v těchto formách metodou atomové absorpční spektrometrie s atomizací v grafitové kyvetě (GF AAS) není mineralizace nutná (**B**). Byly vyvíjeny nové metody charakterizace stopových koncentrací v materiálech pro moderní technologie (**C**). Experimentálně byla prokázána interakce bromu a jodu ve štítné žláze, která nabývá významu zvláště při nedostatku jodu v potravě (**B**). Metodika stanovení basálních koncentrací stroncia v krevní plasmě technikou GF AAS byla ověřena na kontrolních vzorcích a použita k analýze 210 vzorků (**C**).

Oblast superkritické fluidní extrakce a chromatografie

Instrumentace pro superkritickou fluidní extrakci (SFE) vodných médií oxidem uhličitým byla zdokonalena a aplikována na modelové i reálné vzorky (**B**). Pokračoval vývoj mikronáplňových kolon pro SFC (**C**). Byl vypracován termodynamický model vlivu příměsi helia na solvatační schopnost oxidu uhličitého v SFE a SFC (**B**).

Oblast analytické chemie životního prostředí

V rámci vývoje metod současného stanovení aniontů NO_3^- a NO_2^- v tělních tekutinách bylo prokázáno, že po oddělení vysokomolekulárních komponent lze tyto anionty přímo stanovit v systému průtokové analýzy (FIA) chemiluminiscenční reakcí po redukci NO_3^- na NO_2^- , a byly podniknuty předběžné pokusy s cílem tento postup automatizovat (**C**). Bylo zahájeno dlouhodobé monitorování koncentrací srdečních arytmií prokainamidu a N-acetylprokainamidu ve vybraných tkáních laboratorních zvířat (**C**).

c) V souladu s doporučeními Akademického hodnotitelského grémia se ústav snaží o intenzivnější spolupráci s vysokými školami a usiluje o získání soudobého přístrojového vybavení.

e) Ukázkami moderních separačních metod a výkladem jejich principů a aplikací se ústav podílel na vzdělávacím semináři pro středoškolské profesory přírodovědných oborů (Podzimní škola Šlapanice '97), který uspořádala Nadace Charty 77 v rámci programu Astra 2000. Ve spolupráci s Institutem pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví byl na ústavu uspořádán dvoudenní seminář "Analytická superkritická fluidní extrakce" pro laboratorní pracovníky hygienické služby. Své ročníkové práce v ústavu zpracovávaly dvě studentky Střední průmyslové školy chemické v Brně. V ústavu se také dvakrát ročně pořádá instruktážní přednáška na téma "Životní prostředí" pro učitele chemie na základních školách okresu Brno-venkov.

2. Spolupráce pracoviště s vysokými školami a dalšími domácími institucemi

2.1. Jmenovité zhodnocení všech významných domácích spoluprací pracoviště s našimi vysokými školami

a) Vědecká spolupráce ústavu s vysokými školami, totiž s Masarykovou universitou v Brně, Universitou Pardubice, Universitou Palackého v Olomouci, Vysokou školou chemicko-technologickou v Praze, Karlovou universitou, VUT v Brně, Mendelovou zemědělskou a lesnickou universitou v Brně, ČVUT v Praze a s Vysokou školou pozemního vojska ve Vyškově probíhá v rámci 10 společných grantových projektů, které podstatně přispěly k výsledkům shrnutým v části 1.b) této zprávy. V celkovém hodnocení výzkumné spolupráce s vysokými školami lze ovšem říci, že nabídka ze strany ústavu převyšuje zájem ze strany vysokých škol.

b) Ústav provozuje společně s Českou zemědělskou universitou a Českým geologickým ústavem Sdruženou ultrastopovou laboratoř (Praha 5 - Barrandov); příslušná smlouva o sdružení byla uzavřena podle §829 ad. Občanského zákoníku na dobu neurčitou. Laboratoř se v roce 1997 soustředila zejména na problematiku stanovení velmi nízkých koncentrací arzenu a stroncia v tělních tekutinách. Centrum analytické chemie molekulárních struktur, které působí v rámci spolupráce s Universitou Palackého v Olomouci na projektu MŠMT VS 96021, se zabývalo metodologií elektromigračních technik a jejich aplikacemi k analýze biopolymerů.

c) Příprava nových vědeckých pracovníků ústavu probíhá v ústavu, je řízena pracovníky ústavu a její věcná náplň je součástí programu příslušné skupiny; po stránce organizační je zajištěna formou postgraduálního studia na Přírodovědecké fakultě MU v Brně, na Universitě Pardubice a na Přírodovědecké fakultě UK v Praze. Kromě toho se v laboratořích ústavu a pod odborným vedením pracovníků ústavu školili 3 diplomanti, 1 externí doktorand, 3 studenti v ústavu působili jako pomocné vědecké síly a 2 v ústavu absolvovali třítydenní odbornou praxi.

2.2. Zhodnocení spolupráce s dalšími mimovysokoškolskými výzkumnými a mimoakademickými pracovišti

Pracovníci ústavu se podíleli na společných projektech se 6 pracovišti. Výsledky kooperací se Státním zdravotním ústavem Praha a s oddělením humánní genetiky Dětské nemocnice v Brně jsou zahrnuty v části 1.b) této zprávy. Spolupráce s výzkumným oddělením firmy Biovendor s.r.o. v Brně se týkala vývoje rychlých a citlivých metod sekvenování DNA. Ve spolupráci s firmou SEKO-K s.r.o. v Brně byl vyvíjen přístroj pro extrakci kapalnými rozpouštědly za vysokých tlaků a teplot, který navazuje na dřívější kooperace při vývoji termálního desorbéru a superkritického fluidního extraktoru SE-1. Společný projekt s firmou IMOS Holding s.r.o. v Brně zahrnoval studium distribuce emisí motorových vozidel. Byla zahájena neformální spolupráce s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně v oblasti detekce biomarkerů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF a v oblasti charakterizace proteinů indikujících zánět mléčné žlázy krav.

3. Mezinárodní vědecká spolupráce pracoviště

a) Zahraniční pracoviště v oblasti separačních a spektrálních metod analytické chemie, s nimiž pracovníci UIACH v roce 1997 udržovali pracovní kontakty, zahrnují mj.:

Istituto di Cromatografia del C. N. R., Řím, Itálie (Dr. S. Fanali),

Istituto di Chimica Analitica Strumentale del C. N. R., Pisa, Itálie (Dr. A. D'Ulivo),

Barnett Institute, Northeastern University, Boston (MA), USA (Prof. B. Karger),

Department of Chemistry, Indiana University, Bloomington (IN), USA (Prof. M.

Novotný),

Institut für klinische Pharmakologie, Universität Bern, Švýcarsko (Prof. W. Thormann),

Department of Physical Chemistry, University of Leeds, Leeds, Velká Británie (Prof.

K. D. Bartle),

Department of Chemistry, University of Tasmania, Hobart, Austrálie (Prof. P. R. Haddad),

Sektion Analytik und Höchstreinigung, Universität Ulm, SRN (Prof. V. Krivan) a

Netherlands Energy Research Foundation (ECN), Petten, Holandsko (Prof. J. Slanina).

Výsledky těchto spoluprací jsou začleněny v části 1.b) této zprávy.

b) Ústav se v roce 1997 nepodílel na pořádání mezinárodních konferencí.

c) Ústav se podílel na řešení grantu Komise Evropských společenství COPERNICUS CIPA-CT94-0146.

4. Předpokládané hlavní okruhy vědecké činnosti pracoviště v roce 1999

Oblast separace, charakterizace a mikropreparace biopolymerů a částic

Vývoj metodiky analýz DNA pomocí CZE bude nadále orientován na zvýšení rychlosti a selektivity separace fragmentů DNA. Bude rozvíjeno využití CZE k separaci sacharidů. Kapilární IEF bude orientována především na separaci bílkovin a na charakterizaci vyvíjených nízkomolekulárních pI-markerů. Budou ověřovány možnosti aplikace programované intenzity pole v FFF k separacím škrobových zrn a částic silikagelu. Budou hledány nové způsoby charakterizace biopolymerů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Oblast teorie a metodologie elektromigračních metod

Bude pokračovat snaha o detailní teoretický popis tvaru a velikosti elektroforetických píků včetně píků systémových. Výsledky teoretického a experimentálního studia kombinace ITP-CZE budou využity v aplikacích této techniky na vzorky klinického a biologického původu. Bude rozvíjeno teoretické i experimentální studium využití kontinuálních gradientů pro izotachoforetickou fokusaci. Budou hledána nová vhodná barviva pro charakterizaci a detekci v kapilárních elektromigračních technikách. Bude pokračovat studium nových možností modifikace vnitřního povrchu křemenných kapilár.

Oblast stopové prvkové analýzy

Budou vyvíjeny experimentální postupy umožňující reatomizaci volných atomů v pozorovaném objemu spektrometru AAS a bude testována reaktivita dalších materiálů (vedle křemene) vůči volným atomům. Bude ověřena konstrukce křemenného trubcového atomizátoru v L-uspořádání. Bude učiněn pokus nalézt kritérium pro hodnocení stavu zásobení organismu jodem pomocí rovnovážného poměru koncentrací jodu a bromu ve štítné žláze. Budou hledány nové přístupy při využití generování a atomizace těkavých sloučenin

pro ultrastopovou analýzu pomocí AAS. Bude pokračovat spolupráce se Státním zdravotním ústavem při řešení problematiky ultrastopových obsahů analytů v biologickém materiálu.

Oblast superkritické fluidní extrakce a chromatografie

Bude pokračovat vývoj instrumentace a metodiky pro SFE vodných médií, pro extrakci kapalnými rozpouštědly za vysokých tlaků a subkritických teplot a vývoj instrumentace mikronáplňové SFC. Bude zpracována termodynamická analýza vlivu teploty, tlaku a složení mobilní fáze na selektivitu v SFC.

Oblast analytické chemie životního prostředí

Bude vyvinuta instrumentace pro monitorování koncentrací amoniaku a anorganických oxosloučenin dusíku ve vzduchu v reálném čase. Bude pokračovat studie časových závislostí koncentrací srdečních arytmií ve vybraných tkáních laboratorních zvířat.

V Brně dne 20. ledna 1998

Prof. RNDr. Petr Boček, DrSc.
ředitel UIACH AV ČR