

Výroční zpráva Ústavu analytické chemie AV ČR za rok 2001

1. Vědecká činnost pracoviště a uplatnění jejích výsledků

a) Stejně jako v předcházejícím roce spadala vědecká činnost UIACH AV ČR do oblasti separačních a spektrálních metod analytické chemie.

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

Oblast separace, charakterizace a mikropreparace biopolymerů a částic

Aplikace kapilární zónové elektroforézy (CZE) pro rychlé a extrémně citlivé diagnostické techniky pokračovaly výzkumem detekčních metod pro studium buněčné apoptózy a vývojem metod pro molekulární identifikaci patogenních organismů a diagnostiku některých dědičných metabolických vad (**B**). Nejdůležitějším tématem výzkumu v oblasti CZE analýz fragmentů DNA byla automatizovaná kolekce frakcí (**B**). Byla navržena a ověřena nová metoda separace a citlivé fluorescenční detekce proteinů pomocí CZE s využitím dynamické modifikace analyzovaných makromolekul fluorescenční sondou pyrenbutanoátem (**B**). Bílkoviny z ječmene (*Hordeum vulgare L.*) byly identifikovány s využitím kombinace gelové elektroforézy pro separaci bílkovin ze směsi a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro stanovení hmotnosti enzymaticky naštípaných peptidů spolu s počítačovým vyhledáváním v databázích. Bílkoviny byly izolovány buď z listů nebo ze zrn, potom separovány jednorozměrnou SDS gelovou elektroforézou (SDS-PAGE) a následně enzymaticky rozloženy na peptidy pomocí trypsinu přímo v separačním gelu (**B**).

Oblast teorie a metodologie elektromigračních metod

V rámci pozornosti věnované správnému výběru elektroforetického systému pro zónovou elektroforézu byly studovány elektrolyty obsahující multivalentní slabé kyseliny nebo báze. V těchto systémech se jednotlivé formy disociované do různého stupně chovají jako navzájem nezávisle migrující koionty, tj. vnášejí do systému dvě centra symetrie projevující se migrující systémovou zónou, jejíž mobilita leží mezi těmito centry symetrie. Tato systémová zóna ovlivňuje negativně separaci i detekci analytů pohybujících se v její těsné blízkosti. Byla formulována pravidla, která umožňují vyhnout se existenci této zóny (**B**). U reálných vzorků biologického původu s vysokým obsahem balastních komponent je třeba brát v úvahu řadu efektů ovlivňujících průběh separace, jako např. elektromigrační disperzi a izotachofózu. Byla provedena studie zaměřená na správný postup při kvantifikaci založené na vyhodnocení záznamu z výšky píku při použití UV-absorbanční detekce. Tato studie definovala podmínky, za nichž lze dosahovat lineárních křivek s vysokou citlivostí a nízkým detekčním limitem (**B**). Byly vyvinuty a ověřeny nové fluorescenční amfolyty vhodné jako standardy izoelektrického bodu pro kapilární izoelektrickou fokuzaci s fluorescenční detekcí indukovanou argonovým laserem (**B**).

Oblast stopové prvkové analýzy

Difuzní koeficienty několika analytů lišících se chováním v grafitových atomizátorech (Pb, Au, In, Cr) byly stanoveny dvěma odlišnými přístupy: experimentálně z rezidenčních časů zjištěných ve dvou odlišných speciálně navržených grafitových atomizátorech a teoreticky semiempirickým výpočtem. Srovnání obou přístupů umožňuje posoudit spolehlivost jednotlivých zdrojů vstupních dat užívaných pro semiempirické výpočty (**B**). Byla optimalizována konstrukce multiatomizátoru vzhledem k dalšímu zlepšení odolnosti vůči atomizačním interferencím a dynamického rozsahu. Výsledky experimentů ukazují, že jsme se přiblížili k ideálnímu stavu, v němž je podstatná část pozorovaného objemu atomizátoru

vyplněna volnými radikály (**B**). Byl sledován vliv vysoké expozice bromidu na přenos jodu mateřským mlékem laboratorního potkana na kojená mláďata. Bylo zjištěno, že za uvedených podmínek dochází ke snížené produkci mateřského mléka, snížení přenosu jodu a částečnému nahrazení chloridu bromidem v přijímaném mléce (**B**).

Oblast superkritické fluidní extrakce a chromatografie

Předchozí studie superkritické fluidní extrakce odrůdových vín s mezikrokem sorpce aromatických látek na pevném sorbentu byly doplněny přímou extrakcí vín a analýzou extraktu pomocí GC-MS. V porovnání s postupem využívajícím sorpce na pevném sorbentu vedla diskriminační a kanonická analýza výsledků přímé extrakce k mnohem lépe definovanému rozlišení jednotlivých odrůd vín (**B**). "Off-line" kombinace superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF byla použita pro nalezení distribuce molekulových hmotností vzorků silikonových olejů (**B**, viz též anotaci významného výsledku). Z retenčních dat vyšších *n*-alkanů v superkritické fluidní chromatografii byly odvozeny termodynamické veličiny významné pro popis zředěných roztoků příslušných alkanů v superkritickém oxidu uhličitém (**B**).

Oblast analytické chemie životního prostředí

Byl vyvinut a otestován jednoduchý a cenově přijatelný analyzátor amoniaku v ovzduší (**C**). Byly zahájeny práce na vývoji nového aerosolového kolektoru pro kontinuální odběr jemné frakce atmosférických aerosolů (**B**). Vzorkovače na bázi semipermeabilních membrán byly úspěšně aplikovány pro vzorkování polycyklických aromatických uhlovodíků o vyšší molekulové hmotnosti (>278) v oblasti kontaminované petrochemickou výrobou (**C**).

d) Stejně jako další ústavy AV ČR uspořádal Ústav analytické chemie Den otevřených dveří (19. 10. 2001). Při této příležitosti se s naší činností seznámilo celkem 101 zájemců, což bylo na hranici kapacitních možností Ústavu; naprostou většinu návštěvníků tvořili studenti 3. a 4. ročníků brněnských středních škol v rámci předem dohodnutých exkurzí. Pracovníci ústavu však zajišťují i řadu dalších popularizačních aktivit, z nichž některé už mají v lokálním měřítku značnou tradici. Patří sem například každoroční exkurze studentů 4. ročníku oboru "Měřicí technika" na Fakultě elektrotechnické VUT v Brně, exkurze studentů 4. ročníku MZLU, každoroční popularizační přednášky pro učitele základních škol s aprobací chemie - biologie, přednáška na Seminári mladých badatelů, pořádaném Vojenskou vysokou školou pozemního vojska ve Vyškově a přednášky na kurzu HPLC/MS pořádaném Universitou Pardubice.

e) Vzhledem k tomu, že v hodnocení výzkumných záměrů nebyly žádné konkrétní změny navrženy a definitivní rozpočet a počet kmenových pracovníků UIACH AV ČR byl schválen až 12.12. 2001, nebyla konkrétní opatření vycházející z hodnocení dosud učiněna. Provedená strukturální opatření vycházejí ze změn a potřeb ústavu nezávislých na hodnocení. Nicméně důsledky definitivního rozpočtu a zejména počtu kmenových pracovníků vyvolávají nutnost konkrétních personálních změn. Hlavní příčinou je zřízení nového oddělení bioanalytické instrumentace vedeného pracovníkem, který se do ústavu vrátil po 9 letech pracovního pobytu v USA. V této souvislosti by bývalo potřeba zvýšit přepočtený stav kmenových pracovníků UIACH nejméně o 2 místa, což se bohužel nepodařilo. Proto bylo nutné vzít 3 pracovní místa z jiných oddělení, čímž se některá z nich dostala do svízelné personální situace. Z pohledu UIACH AV ČR vyhlížejí úvahy AR o podpoře projektů špičkových vědeckých pracovníků, vracejících se z dlouhodobých stáží, jako pouhé proklamace. Z těchto důvodů bude v roce 2002 nezbytné provést analýzu efektivnosti činnosti pracovníků s cílem zredukovat nejméně

efektivní programy a posílit ty efektivnější a progresivnější. Tato analýza bude součástí příprav na atestace.

f) K 1.dubnu 2001 bylo v UIACH AV ČR zřízeno nové oddělení bioanalytické instrumentace, zabývající se především rozvojem miniaturizovaných (čipových) separačních technik. Dosavadní oddělení separace biopolymerů bylo k 1.11. 2001 rozděleno na dvě nová – oddělení analýzy biopolymerů a oddělení proteomiky.

2. Spolupráce pracoviště s vysokými školami

Jmenovité zhodnocení všech významných domácích spoluprací pracoviště s našimi vysokými školami:

a) Vědecká spolupráce ústavu s českými vysokými školami probíhala převážně v rámci 7 společných grantových projektů (GA ČR, GA AV ČR), které podstatně přispěly k výsledkům shrnutým v části 1.b) této zprávy, a zahrnovala Universitu Karlovu (1 projekt), Masarykovu universitu v Brně (2 projekty), Mendelovu zemědělskou a lesnickou universitu v Brně (2 projekty), Universitu Palackého v Olomouci (1 projekt) a Universitu Pardubice (1 projekt).

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. Výsledky činnosti laboratoře jsou zahrnuty v bodě 3b) této zprávy. Spolupráce s Centrem analytické chemie molekulárních struktur, které působilo při Universitě Palackého v Olomouci v rámci projektu MŠMT VS 96021, se soustředila na problematiku využití CZE pro studium biochemické aktivity alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu. Ukázalo se, že nenabitě formy těchto látek interagují se sulfhydrylovými (-SH) skupinami organických sloučenin. Byly změřeny konstanty stability komplexů těchto alkaloidů s lidským a hovězím sérovým albuminem.

c) Vědecká výchova byla v roce 2001 organizačně zajištěna formou doktorandského studia (celkem 13 účastníků) na Mendelově zemědělské a lesnické universitě v Brně, na Vysokém učení technickém v Brně, na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, na Universitě Palackého v Olomouci a na Universitě Pardubice. Kromě toho se v laboratořích ústavu a pod odborným vedením pracovníků ústavu školilo 9 diplomantů a 7 studentů v ústavu působilo jako pomocné vědecké síly. K přípravě nových vědeckých pracovníků v širším smyslu přispívají i přednášky pracovníků ústavu na vysokých školách a laboratorní cvičení pro studenty v laboratořích ústavu a pod vedením pracovníků ústavu. Ve snaze o posílení motivace mladých pracovníků (do 33 let) prezentovat vlastní výsledky na mezinárodních i tuzemských konferencích a tím získávat zkušenosti a kontakty bylo v roce 2001 zorganizováno 1. kolo "*Soutěže mladých pracovníků UIACH AV ČR o finanční podporu účasti na symposiích*".

d) Rozšířením akreditace Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci v roce 2000 získal ústav akreditaci pro obor "Analytická chemie" doktorského studijního programu "Analytická chemie". V návaznosti na příslušnou rámcovou smlouvu mezi AV ČR a VUT v Brně, resp. mezi AV ČR a MZLU v Brně uzavřel Ústav analytické chemie AV ČR smlouvu o spolupráci při uskutečňování doktorských studijních programů s Fakultou chemickou VUT v Brně, resp. s Agronomickou fakultou MZLU v Brně a neformálně s Universitou Pardubice.

3. Spolupráce pracoviště s dalšími institucemi a s podnikatelskou sférou

Zhodnocení spolupráce s dalšími mimovysokoškolskými výzkumnými a mimoakademickými pracovišti:

a) Spolupráce s Výzkumným ústavem zdraví dítěte (Brno) probíhá v rámci grantů GA ČR 203/00/0772 *Vývoj ultracitlivých analytických metod pro molekulární identifikaci a diagnostiku závažných chorob* (nositelem je UIACH AV ČR, dalším spolunositelem LF MU v Brně) a GA ČR 303/00/0928 *Cystinurie - biochemická a molekulárně biologická studie* (nositelem je Universita Palackého v Olomouci, dalším spolunositelem je Všeobecná fakultní nemocnice Praha 2). Spolupráce s Výzkumným ústavem potravinářským (Praha) probíhá v rámci grantů QD1005 *Vliv distribuce velikosti škrobových zrn na technologickou kvalitu ječmene* (nositelem je Výzkumný ústav potravinářský, vedle UIACH AV ČR je dalším spolunositelem Výzkumný ústav pivovarský a sladařský a zadavatelem Ministerstvo zemědělství ČR) a QD1023 *Analýza glutenu (lepku) a sledování kvality bezpečných potravin a surovin* (nositelem je UIACH AV ČR, dalšími spolunositeli jsou MBU AV ČR, Sdružení celiaků ČR a Immunotech, a.s. a zadavatelem je Ministerstvo zemědělství ČR). Výsledky těchto spoluprací jsou zahrnuty v části 1.b) této zprávy.

b) Spolupráce se Státním zdravotním ústavem (Praha) na úkolu *Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva* (projekt MZ ČR) se týkala stanovení ultrastopových koncentrací těžkých kovů v prašných aerosolech a zahrnovala přípravu testovacích materiálů pro mezilaboratorní srovnávání, zajištění kvality výsledků a dodávání vztažných hodnot. V rámci této spolupráce, která zahrnovala i Ústav jaderné fyziky AV ČR, se podařilo doplnit testovací materiály, dosud připravované v laboratořích Mezinárodní agentury pro atomovou energii v Rakousku, i o materiály připravené z odběrů ve větracích šachtách strahovského tunelu.

c) Dlouhodobá spolupráce s firmami SEKO-K s.r.o., Brno a Applied Separations, Inc., Allentown, Pennsylvania, USA na vývoji laboratorních zařízení pro kapalinovou extrakci za vysokých teplot a tlaků pokračovala i v roce 2001 a zdá se, že bude možno ji udržet i po náhlém úmrtí jejího původce, Ing. Jiřího Vejrosta, CSc., dne 8.7.2001. Ve spolupráci s farmaceutickým resortním výzkumem (Výzkumný ústav léčiv, Modra, Slovenská republika) byly pomocí HPLC/MS a tandemové hmotnostní spektrometrie identifikovány a potvrzeny struktury složek vyvíjených preparátů. Spolupráce s firmou Test-line, s.r.o, Brno zahrnovala aplikaci hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF k potvrzení struktury proteinů pro využití v oblasti klinické biochemie. Spolupráce s firmou IMOS s.r.o., Brno zahrnovala vyhodnocení kontaminace okolí komunikací s intenzivním provozem polycyklickými aromatickými uhlovodíky a polychlorovanými bifenyly.

d) V roce 2001 UIACH AV ČR neposkytl státním orgánům žádná písemně zpracovaná odborná stanoviska nebo posudky (pokud sem samozřejmě nepočítáme řadu individuálních stanovisek jednotlivých pracovníků ústavu, především posudky grantových přihlášek, a neformální konzultace, týkající se specializované terminologie pro anglicko-český chemický slovník připravovaný Armádou ČR).

4. Mezinárodní vědecká spolupráce pracoviště

- a) Ústav se v roce 2001 podílel na řešení následujících grantů se zahraniční účastí:
Development of Rapid Methods for Assessing the Quality of Starch Particles from Various Cereal Species for Purposes of Agriculture and Food Industry, INCO Copernicus, Proposal No. ERB 3512 PL 979070, Contract No. ERB IC15-CT98-0909 (tento grant je vědecky koordinován z Ústavu analytické chemie AV ČR).
Cycling of Trace Metals in Sustainable Management of Agricultural Soils, INCO Copernicus, Proposal No. ERB 3512 PL 971161, Contract No. ERB IC15-CT98-0124.
Subgrid Scale Investigations of Factors Determining the Occurrence of Ozone and Fine Particles SUB-AERO, INCO Copernicus, No. SUB-AERO-EVK2-CT-1999-0052 SUB-AERO.
Organic Aerosols (complementary project to SPSD II EV/02/11).

b) Mezi nejvýznamnější vědecké výsledky, získané v rámci mezinárodní spolupráce, patří část výsledků v oblasti ultra-rychlých separací fragmentů DNA (spolupráce s Barnett Institute, Northeastern University, Boston, USA), v oblasti studia mechanismu atomizace v AAS (spolupráce s Istituto di Chimica Analitica Strumentale del C.N.R., Pisa, Itálie), v oblasti měření difuzních koeficientů analytů v grafitových atomizátorech pro AAS (vývojové oddělení fy Cortech, Moskva, Rusko), v oblasti vývoje předkoncentračních a předseparačních postupů pro CZE (Eindhoven University of Technology, Eindhoven, Holandsko a Universita v Bernu, Švýcarsko), v oblasti metod hmotnostní analýzy (spolupráce s Universitou ve Vídni) a v oblasti vývoje rychlých metod pro stanovení kvality škrobových zrn z různých druhů obilovin (spolupráce s universitami v Lundu, Ferrare, Bologni, Patrasu, Limoges a Moskvě).

c) Ve dnech 3.-4. září 2001 v ústavu proběhlo mezinárodní mikrosymposium "*Characterization of Macromolecules and Particles of Biological Origin*", které bylo tématicky soustředěno na materiály odvozené ze škrobu.

d) Z významných zahraničních vědců navštívili ústav Prof. R. Bye (Universita v Oslo, Norsko), Dr. A. D'Ulivo (Istituto di Chimica Analitica Strumentale del C.N.R., Pisa, Itálie), Prof. K.-G. Wahlund (University of Lund, Švédsko), Dr. P. Cardot (Université de Limoges, Francie), Dr. G. Karaiskakis (University of Patras, Řecko), Dr. S. Semjonov (Institute of Biochemical Physics, Moskva, Rusko), Prof. F. Dondi (University of Ferrara, Itálie), Dr. P. Reschiglian a Dr. A. Zattoni (University of Bologna, Itálie).

5. Předpokládané hlavní okruhy vědecké činnosti pracoviště v roce 2002

Oblast separace, charakterizace a mikropreparace biopolymerů a částic

Dosavadní práce v oblasti analýz fragmentů DNA pomocí CZE budou rozšířeny i na analýzy peptidů a proteinů s využitím miniaturizovaných systémů a hmotnostní spektrometrie. V projektu charakterizace biopolymerů v ječmeni bude pozornost zaměřena na způsoby extrakce bílkovin z ječmenné obilky pomocí různých rozpouštědlových systémů kompatibilních s naší proteomickou metodou, která se jeví jako účinná, přestože v případě ječmene je známo jen asi 20% genomu a navíc existuje značné množství odrůd ječmene.

Oblast teorie a metodologie elektromigračních metod

V rámci mapování elektrolytových systémů budou studovány základní elektrolyty, které jsou často používány, avšak díky interakcím koiontu a protiiontu není jejich aktuální složení ani elektromigrační chování exaktně známo (příkladem je borátový pufr). Bude vytvořen program umožňující zvolit vhodný elektrolytový systém z databáze již publikovaných systémů pro sledovaný analyt v konkrétní matici nebo pro analyt s podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, vyhledaný programem na základě podobnosti v chemickém názvosloví a fyzikálně-chemických parametrů. Bude zahájen systematický výzkum chirálních separací aniontových klastrových sloučenin boru s použitím nativních i derivatizovaných cyklodextrinů jako chirálních selektorů. Výzkum doprovodných elektrokinetických efektů v separačních metodách bude zaměřen na poznání vlivu elektrické vodivosti pevné fáze na generaci proudu proudění v loži zrněné pevné fáze. Bude zahájeno systematické studium vlivu složek separačních systémů CZE a LC na povrchový náboj křemene. Bude vyvíjena miniaturizovaná instrumentace pro elektroforézu a elektrochromatografii a bude pokračovat vývoj fluorescenčních standardů pro elektroforetické metody.

Oblast stopové prvkové analýzy

Bude pokračovat optimalizace generování hydridů pro „flame-in-gas shield“ atomizátor a studium interferencí při *in-situ* záchytu v grafitovém atomizátoru. Budou provedeny experimenty s radioaktivním izotopem Se a připraveny izotopy As a Hg s vysokou specifickou radioaktivitou. Bude testováno elektrolytické odstranění interferentu při elektrochemickém generování selenovodíku a elektrochemická cela s katodou zhotovenou z granulovaného olova. Bude pokračovat studium vlivu vysokých dávek bromidu na přenos jodu mateřským mlékem za podmínek jodové deficiencie. V rámci charakterizace zátěže obyvatel malých sídel škodlivinami z ovzduší a znečištění ovzduší bioaerosoly bude studováno znečištění vybranými stopovými prvky. Budou připraveny testovací materiály pro zajištění QA/QC v rámci monitorování stopových prvků v ovzduší. Budou hledány další možnosti přípravy vhodného testovacího materiálu, testována jeho homogenita pro různé návážky, stabilita a budou určeny vztažné hodnoty sledovaných analytů.

Oblast superkritické fluidní extrakce a chromatografie

Vývoj aplikací kontinuální superkritické fluidní extrakce vodných médií oxidem uhličitým bude zaměřen na metody stanovení vyšších mastných kyselin v pivech. Bude pokračovat vývoj a využití automatizovaného zařízení pro off-line spojení superkritické fluidní chromatografie a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Termodynamické aplikace superkritické fluidní chromatografie budou zaměřeny na výpočty termodynamických veličin z retenčních dat v systémech s klasickými stacionárními fázemi a na předběžné testy iontových kapalin v roli stacionárních fází.

Oblast analytické chemie životního prostředí

Budou probíhat práce na vývoji metod stanovení organických aerosolů v ovzduší. Ve spolupráci s Ústavem pro materiály a měření (IRMM) Evropské komise bude v rámci Mezinárodního programu pro vyhodnocování měření (IMEP) vyvíjen referenční standard vody. Vývoj metod vzorkování organických polutantů s využitím semipermeabilních membrán bude zaměřen na ověření možnosti vzorkování biodostupné frakce těchto látek v půdách.

V Brně dne 15. ledna 2002

RNDr. Josef Chmelík, CSc.
ředitel UIACH AV ČR