

Výroční zpráva Ústavu analytické chemie AV ČR za rok 2004

1. Vědecká činnost pracoviště a uplatnění jejích výsledků

a) V roce 2004 spadala vědecká činnost UIACH AV ČR stejně jako v předchozích letech do oblasti separačních a spektrálních metod analytické chemie. Z pohledu objemu publikovaných výsledků byl rok 2004 pro ústav úspěšný; součet impaktních bodů publikací ústavu, po odečtení alikvotního podílu spoluautorů z jiných pracovišť, opět mírně vzrostl na cca 59 z předchozích hodnot 57 v roce 2003 a 55 v roce 2002.

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

Oblast separace, charakterizace a mikropreparace biopolymerů a částic

Aplikace spojení separačních metod s hmotnostní spektrometrií (především MALDI-TOF/TOF MS) byly soustředěny především na optimalizaci proteomické procedury a využití nespecifických peptidů pro stanovení obilných bílkovin (**B**, Anotace č. 1). Z mouky byla extrahována směs glykoproteinů a bílkovin, jež byla následně separována pomocí gelové elektroforézy a případně i afinitní chromatografie. Vyhodnocení MS spekter peptidových digestů a fragmentačních spekter jednotlivých peptidů vyústilo v identifikaci několika glutenových bílkovin (**B**). Další výzkum byl soustředěn na dokázání přítomnosti sójových bílkovin v masných výrobcích a ve směsích sóji a masa. Pro tento účel byly použity postupy proteomiky u izolovaných bílkovin s molekulovou hmotností shodnou s podjednotkami sójových bílkovin. V kombinaci s HPLC byly v modelové směsi identifikovány peptidy ze sójové bílkoviny.

V rámci studia a charakterizace sacharidů v jehlicích smrku ztepilého pomocí gelové permeační chromatografie a asymetrické flow-field frakcionace částic v poli tokem (AsFFFF) byly provedeny analýzy extraktů vzorků jehlic. Vedle potvrzení přítomnosti řady mono- a oligosacharidů byly pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF a ESI MS) studovány oligo- a polysacharidy. Pozornost byla zaměřena na sledování a popis chování sacharidů s různými typy vazeb ve srovnání obou iontových módů. Byla ověřena možnost modifikace sacharidů methylací nebo přidávkem anorganických solí pro lepší identifikaci a určení sekvence cukerných reziduí (**B**). Pomocí frakcionace tokem v gravitačním poli (GFFF) byly měřeny poměry velikostí škrobových zrn sladovnických i nesladovnických odrůd ječmene (**B**). Nově vyvinutá technika dynamického značení mikroorganismů umožnila citlivou detekci jednotlivých mikrobů po jejich separaci kapilární elektroforézou (**B**, Anotace č. 2).

Oblast teorie a metodologie elektromigračních metod

Byl vypracován nový způsob popisu migrujících elektroforetických rozhraní založený na tzv. rychlostním diagramu, který znázorňuje vztah mezi lokální koncentrací každého bodu migrujícího difuzního nebo ostrého rozhraní a jeho rychlostí. Nový model vedl k objevu dosud nepopsaného typu migrujícího rozhraní, které je zčásti ostré a zčásti disperguje, a umožnil předpovědět jeho výskyt a vlastnosti (**B**). Byl studován vliv protiiontu na průběh separace mikrokomponent v přítomnosti makrokomponent v nejpoužívanějším elektrolytovém systému v kapilární zónové elektroforéze složeném z borátu jako koiontu a sodíku jako protiiontu. Zjistili jsme, že se v tomto systému vytváří na počátku separace za určitých podmínek nepufrovaná zóna o vysoké hodnotě pH a přítomnost makrosložek vede k rozmývání zón a výraznému zhoršení separační účinnosti. Problém lze řešit zajištěním podmínek pro podmíněně stabilní izotachoretický krok nebo použitím jiného protiiontu,

který zajistí nízkou mobilitu hydroxylových iontů v systému a umožní zvýšit separační účinnost pomocí přechodného izotachoretického migračního modu (**B**). Poznatky z výzkumu vlastností aniontových klastrových sloučenin boru a jejich chování za podmínek elektroforetických separací ve vodně-organických roztocích umožnily zvýšit citlivost detekce i účinnost separací o 1-2 řády. Pro chirální separace sloučenin s jedním klastrem je vhodný α -cyklodextrin, pro separace sendvičových kobaltových komplexů β -cyklodextrin (**B**). Řešení aktuálních problémů kapilární elektrochromatografie zahrnovalo automatizaci analýzy a vývoj kolonové technologie a detekčních technik (**C**).

Oblast stopové prvkové analýzy

V rámci studia možností aplikace atomové absorpční (AAS) a atomové fluorescenční spektrometrie (AFS) pro speciální analýzu byl sestaven kontinuální generovací systém pro speciální As pomocí vymrazování a byly optimalizovány podmínky pro selektivní generování hydridu z jednotlivých sloučenin arsenu a pro jejich detekci v multiatomizátoru pro AAS (**B**). Byl nalezen nový způsob prekoncentrace antimonu pro jeho stanovení metodami atomové spektrometrie. Je založený na generování stibanu, jeho zachytu v křemenné pasti a následném uvolnění zachyceného analytu, jeho atomizaci a detekci některou z metod analytické atomové spektrometrie (**B**). Ve třech atomizátorech pro AFS (difuzní plamínek, "double flame" a "flame-in-gas shield") byl identifikován nový typ atomizační interference způsobený kontaminací plynů vstupujících do atomizátorů kyslíkem. Identifikace jednotlivých zdrojů kontaminace spolu s poznáním mechanismu interference umožnila se této interferenci vyhnout a tím zkvalitnit celý analytický proces (**B**). Systém pro chemické generování těžkých sloučenin stříbra byl optimalizován ve flow-injection modu a pro detekci v multiatomizátoru pro AAS (**B**).

Oblast superkritické fluidní extrakce a chromatografie

Zdokonalený ověřovací model laboratorního extraktoru pro využití horké (subkritické) vody jako extrakčního média byl použit pro testování výtěžnosti extrakce přírodního náhradního sladidla steviosidu z rostlinného materiálu (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Kapalinná extrakce organickými rozpouštědly za zvýšených teplot a tlaků (PFE) byla vedle extrakce steviosidu rovněž využita ke stanovení obsahu kofeinu a vitamínu E ve vzorcích čajových rostlin různého geografického původu (**B**). V rámci zdokonalování mikronáplňových kolon pro superkritickou fluidní chromatografii (SFC) a HPLC pokračovala optimalizace metod deaktivace náplně. Termodynamické aplikace SFC pokračovaly měřením distribučních koeficientů modelových solutů o různé těžkosti ve dvoufázovém systému tvořeném superkritickým oxidem uhličitým a hexafluorofosforečnanem methylbutylimidazolia, důležitou iontovou kapalinou (**B**).

Oblast analytické chemie životního prostředí

Pokračoval vývoj nekonvenčních obohacovacích technik pro environmentální analýzu s důrazem na metodiku a instrumentaci pro monitorování nemethanových uhlovodíků v ovzduší (kombinace denuderu se stékajícím filmem kapaliny s dávkováním velkých objemů do systému GC/MS), ověření funkce „sběrače“ pro kontinuální záchyt jemné frakce atmosférického aerosolu s protiproudými paprsky aerosolu kapaliny a dlouhodobé ověřování funkce tzv. dry denuderu, který se používá při studiu artefaktů, vznikajících v rámci vzorkování organického aerosolu z ovzduší (**B**). Byl studován mechanismus příjmu polycyklických aromatických uhlovodíků z ovzduší pasivními vzorkovači na bázi semipermeabilních membrán (SPMDs). Popis tohoto procesu pomocí vhodného matematického modelu umožnil odvození příslušných hodnot vzorkovacích rychlostí pro

všech 16 polycyklických aromatických uhlovodíků ze standardního souboru U. S. Environmental Protection Agency (**B**).

c) Do oblasti popularizačních aktivit částečně spadal informační seminář „Ústav analytické chemie AV ČR – od historie po budoucnost“, který jsme pořádali dne 19.5.2004 u příležitosti 80. narozenin Prof. Ing. Jaroslava Janáka, DrSc., zakladatele a prvního ředitele ústavu. Ve spolupráci s Proteomickou sekcí České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a s výrobcí přístrojového vybavení ústav během prvního pololetí 2004 zorganizoval tři informační semináře věnované pokročilým technikám hmotnostní spektrometrie a její kombinace se separačními metodami. Den otevřených dveří Ústavu analytické chemie AV ČR jsme uspořádali v pátek 12.11.2004. Celkem 60 návštěvníků, vesměs studentů (4. ročník řádného studia Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně – Ústav chemie a biochemie Agronomické fakulty MZLU, 4. ročník Střední průmyslové školy chemické v Brně a 4. ročník Gymnasia v Brně–Líšni) se mohlo podrobně seznámit s pokročilými separačními a spektrálními metodami analytické chemie.

e) Po oznámení výsledků letošního hodnocení pracovišť AV ČR byla zrušením oddělení Analýzy biopolymerů zahájena dosud probíhající změna struktury vědeckých oddělení ústavu. V roce 2004 byla nově vytvořena atestační kritéria, na jejichž základě proběhly v ÚIACH periodické atestace; v jejich rámci atestační komise projednala žádosti o atestaci celkem 31 pracovníků a navrhla řediteli ústavu zařazení pracovníků do jednotlivých kvalifikačních stupňů.

2. Vědecká a pedagogická spolupráce pracoviště s vysokými školami

a) Vědecká spolupráce ústavu s českými vysokými školami probíhala převážně v rámci 5 společných grantových projektů (4 × GA ČR, 1 × GA AV ČR), které významně přispěly k výsledkům shrnutým v části 1.b) této zprávy, a zahrnovala Universitu Karlovu (1 projekt), Masarykovu universitu v Brně (3 projekty), Universitu Pardubice (1 projekt) a Mendelovu zemědělskou a lesnickou universitu v Brně (1 projekt).

b) Ústav analytické chemie AV ČR nemá společná pracoviště s vysokými školami a dosud se nepodílel na činnosti žádného výzkumného centra. V roce 2004 podal ústav úspěšnou přihlášku na centrum typu B, jehož činnost bude zahájena v roce 2005.

c) Akreditace doktorského studijního programu Chemie se studijním oborem Analytická chemie, který je uskutečňován Přírodovědeckou fakultou UP v Olomouci a Ústavem analytické chemie AV ČR, je platná do 15. srpna 2006. V návaznosti na příslušnou rámcovou smlouvu mezi AV ČR a VUT v Brně, resp. mezi AV ČR a MZLU v Brně má Ústav analytické chemie AV ČR uzavřeny smlouvy o spolupráci při uskutečňování doktorských studijních programů s Fakultou chemickou VUT v Brně, resp. s Agronomickou fakultou MZLU v Brně. Neformální spolupráce při výchově doktorandů probíhá s Universitou Pardubice a VŠChT Praha. Na základě těchto kooperací se v ústavu během roku 2004 školilo 32 doktorandů, z nichž 2 úspěšně obhájili. Kromě toho v laboratořích ústavu a pod odborným vedením pracovníků ústavu pracovalo na svých diplomových pracích celkem 18 diplomantů. Ve snaze o posílení motivace mladých pracovníků (do 33 let) prezentovat vlastní výsledky na

mezinárodních i tuzemských konferencích a tím získávat zkušenosti a kontakty jsme v roce 2004 zorganizovali 4. kolo "Soutěže mladých pracovníků UIACH AV ČR o finanční podporu účasti na symposiích". Ke spolupráci s vysokými školami samozřejmě přispívají i přednášky a semináře pracovníků ústavu v rámci magisterských a doktorských studijních programů.

3. Spolupráce pracoviště s dalšími institucemi a s podnikatelskou sférou

a) Kooperace Ústavu analytické chemie AV ČR s dalšími mimovysokoškolskými a mimoakademickými výzkumnými pracovišti je podpořena 4 projekty financovanými z veřejných prostředků:

Spolupráce s Fakultní nemocnicí v Brně probíhá v rámci projektu Programu podpory cíleného výzkumu a vývoje IBS4031209 *Kombinace mikročipu s hmotnostní spektrometrií pro vysoce efektivní populační a selektivní screening vrozených metabolických poruch* (příjemcem je UIACH AV ČR).

Spolupráce se Státní rostlinolékařskou správou probíhá v rámci grantu GA AV ČR IAA4031302 *Využití rychlé elektroforetické separace s velmi citlivou fluorimetrickou detekcí pro identifikaci mikroorganismů* (příjemcem je UIACH AV ČR, dalším spolupříjemcem je Masarykova universita v Brně).

Spolupráce se společností Ecom s.r.o. Praha probíhá v rámci projektu Programu podpory cíleného výzkumu a vývoje IBS4031201 *Zařízení pro automatizaci elektrochromatografické a elektroforetické analýzy* (příjemcem je UIACH AV ČR).

Spolupráce s Výzkumným ústavem veterinárního lékařství v Brně probíhá v rámci grantu GA ČR GA525/04/0011 *Identifikace a toxikologické hodnocení těkavých kontaminantů v zemědělském prostředí* (příjemcem je VÚVL).

Spolupráce s Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s. probíhá v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR QD1005 *Vliv distribuce velikosti škrobových zrn na technologickou kvalitu ječmene* (příjemcem je Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., UIACH AV ČR je spolupříjemcem). Spolupráce s Výzkumným ústavem potravinářským (Praha) probíhá v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR QD1023 *Analýza glutenu (lepku) a sledování kvality bezlepkových potravin a surovin* (příjemcem je Výzkumný ústav potravinářský, dalšími spolupříjemci jsou UIACH AV ČR, MBU AV ČR, Sdružení celiaků ČR a Immunotech, a.s.). Výsledky těchto spoluprací jsou zahrnuty v části 1.b) této zprávy.

b) Spolupráce s firmou Alltracel Laboratories Tišnov zahrnovala charakterizaci farmaceuticky významných produktů na bázi oxidované celulózy, vyznačujících se hemostatickým a antiadhezním účinkem.

c) Činnost ústavu v oblasti aplikovaného výzkumu zatím nevedla ke vzniku nových firem.

d) V roce 2004 Ústav analytické chemie AV ČR neposkytl státním orgánům žádné písemně zpracované odborné expertizy (pokud sem samozřejmě nepočítáme řadu individuálních stanovisek jednotlivých pracovníků ústavu, především posudky grantových přihlášek a habilitačních, disertačních a diplomových prací).

4. Mezinárodní vědecká spolupráce pracoviště

a) Ústav se v roce 2004 podílel na řešení následujících projektů v rámci mezinárodních vědeckých programů:

Optimized Hydride Generation Systems for Arsenic Speciation Analysis (projekt v rámci programu *Fogarty International Research Collaboration Award* koordinovaného organizacemi *Fogarty International Center* a *National Institute of Environmental Health Sciences*, USA),

Characterization and Sources of Carbonaceous Atmospheric Aerosols, Belgian Federal Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (OSTC), EV/02/11A.

b) K nejvýznamnějším vědeckým přínosům, získaným v rámci mezinárodní spolupráce, patří část výsledků v oblasti separace a charakterizace biopolymerů a částic (Prof. K. G. Wahlund, Lund University, Švédsko a Prof. G. Allmaier, Technische Universität Wien, Rakousko), výsledky validace tzv. dry denuderu (Prof. W. Maenhaut, University of Gent, Belgie) a část výsledků v oblasti stopové prvkové analýzy (Prof. M. Styblo, University of North Carolina, USA).

Výsledky těchto kooperací jsou zahrnuty v bodě 1b).

c) Dne 9.12.2004 ústav uspořádal minisymposium *Central European Capillary Electrophoresis*, kde pronesli přednášky Prof. E. Kenndler (Universität Wien), Prof. D. Kaniansky (Univerzita Komenského, Bratislava) a Prof. B. Gaš (Univerzita Karlova). Vzhledem k tradici ústavu v oboru kapilární elektroforézy předpokládáme opakování minisymposia i v dalších letech.

d) Kromě přednášejících na minisymposiu zmíněném v bodě c) navštívil ústav také Dr. Johan Roeraade (Department of Analytical Chemistry, Royal Institute of Technology [Kungliga Tekniska Högskolan – KTH], Stockholm, Švédsko), významný odborník v oblasti vývoje pokročilých technik hmotnostní spektrometrie a jejich využití v nanochemii.

e) Pokračovaly spolupráce v rámci dvoustranných dohod se společností Gyros (Uppsala, Švédsko) na společném vývoji mikrofabrikovaných zařízení a se společností ABI (Framingham, USA) v oblasti výzkumu bioanalytického využití hmotnostní spektrometrie.

V Brně dne 6. ledna 2005

RNDr. Josef Chmelík, CSc.
ředitel UIACH AV ČR

UIACH – anotace významného výsledku 1:

Řehulka, J., Šalplachta, J., Chmelík, J.:

Optimalizace proteomické procedury a využití nescifických peptidů pro identifikaci obilných bílkovin

Proteomická identifikace obilných bílkovin je důležitý, ale zároveň i obtížný úkol, což je způsobeno především vysokou homologií jejich primárních struktur. To znemožňuje využití obvykle využívané metody peptide mass fingerprinting, a proto je nezbytná fragmentace peptidů, která vyžaduje pečlivou přípravu vzorku (1). Bílkoviny byly separovány pomocí gelové chromatografie s mobilní fází obsahující vysokou koncentraci solí, které bylo nutno před další analýzou odstranit (2). Významného zlepšení identifikace obilných bílkovin bylo dosaženo díky využití fragmentace nescifických peptidů (3). Tato zlepšení umožňují identifikaci řady bílkovin důležitých pro šlechtění odrůd obilovin, potravinářský průmysl a medicínu (identifikace bílkovin vyvolávajících celiakii).

Optimization of proteomic procedure and utilization of nonspecific peptides for identification of cereal proteins

Proteomic identification of cereal proteins is an important and uneasy task, which is caused mainly by high homology of their primary structures. It complicates utilization of peptide mass fingerprinting, therefore fragmentation of peptides becomes necessary, which requires very careful sample preparation (1). The proteins were separated by size exclusion chromatography with a mobile phase containing high concentration of salts that have to be removed prior to further analysis (2). An important improvement of protein identification was reached due to fragmentation of nonspecific peptides (3). It enabled identification of various proteins important for cereal variety breeding, food industry and medicine (identification of proteins inducing the celiac disease).

(1) Řehulka, P., Šalplachta, J., Chmelík, J.: *Improvement of quality of peptide mass spectra in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and post-source decay analysis of salty protein digests by using on-target washing.* - *J. Mass Spectrom.* 38: 1267-1269 (2003).

(2) Šalplachta, J., Řehulka, P., Chmelík, J.: *Identification of proteins by combination of size exclusion chromatography with MALDI-TOF MS and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests.* - *J. Mass Spectrom* 39: 1395-1401 (2004) (published as *FEATURED ARTICLE*).

(3) Řehulka, P., Chmelík, J., Allmaier, G.: *The influence of nonspecific cleavage sites on identification of low molecular mass proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with seamless post-source decay fragment ion analysis.* - *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 79-82 (2005).

UIACH – anotace významného výsledku 2:

Horká, M., Šlais, K.:

Dynamická modifikace mikroorganismů pro on-line detekci v kapilární elektroforéze

Navrhli a ověřili jsme nové dynamické značení mikroorganismů pro jejich on-line fluorimetrickou detekci v kapilární elektroforéze. Nami navržené značení využívá derivát pyrenu – pyrenmásečnou kyselinu, která zároveň funguje jako nenedenaturující tenzid a zároveň generuje fluorescenci označené částice (zelenou) výrazně odlišnou od fluorescence (fialové) okolního prostředí. Tím je umožněna citlivá detekce až jednotlivých různých mikrobů v kapiláře po jejich separaci elektroforézou.

Dynamic modification of microorganisms for on-line detection in capillary electrophoresis

We have proposed and verified a novel dynamic tagging of microorganisms to provide for on-line fluorometric detection of microorganisms in capillary electrophoresis. Our proposal makes use of pyrenebutanoic acid, a pyrene derivative. Pyrenebutanoic acid plays a two-fold role – it serves as a non-denaturing tenside while generating a green fluorescence in the tagged particle to distinguish the particle from a violet fluorescence of the surrounding medium. Thereby, a sensitive detection has been made possible of microorganisms down to individual different microbes after their separation in the electrophoretic capillary.

Horká, M., Růžička, F., Holá, V., Šlais, K.: Dynamic modification of microorganisms by pyrenebutanoate for fluorometric detection in capillary zone electrophoresis. - Electrophoresis, in press.