

$$6.737$$
$$+ 6.735$$


iac
brno

Základ dnešního Ústavu analytické chemie Akademie věd České republiky, v. v. i., byl položen 1. dubna 1956, kdy byla v Brně založena Laboratoř pro analýzu plynů ČSAV, a to převedením malé výzkumné skupiny z Ústavu pro naftový výzkum do bývalé Československé akademie věd. Založení laboratoře bylo z velké části umožněno předvídavostí Františka Šorma, v té době vědeckého tajemníka Československé akademie věd.

Vedoucím původní výzkumné skupiny se stal Jaroslav Janák, který byl až do roku 1980 prvním ředitelem ústavu. Pod jeho vedením získal ústav široké mezinárodní uznání. Pro svou poměrně svobodnomyslnou vnitřní atmosféru začal být ústav v brněnské chemické komunitě postupně znám pod neformálním označením „U Janáků“.

Od roku 1956 se ústav rozrůstal jak v oblasti personální, tak i výzkumné. Původní předměty vědeckého zájmu – analýza plynů a plynová chromatografie – byly doplněny o kapalinovou chromatografii a elektromigrační metody. Nárůst programů a témat byl rámován několika formálními milníky, z nichž posledním byl v roce 2007 přechod Ústavu analytické chemie Akademie věd ČR na právní formu veřejné výzkumné instituce.

Oblast vědeckého zájmu se postupně rozšířila také o problematiku field-flow frakcionace, superkritickou fluidní chromatografii a extrakci a o vybrané specifické techniky environmentální analytické chemie. Ve své historii ústav těžil z rozsáhlé výměny podnětů mezi jednotlivými výzkumnými týmy a tématy. Zejména to platí pro navrhování a vývoj laboratorních přístrojů a nástrojů pro analytické separace a „spočky“ mezi separační metodou a detekční technikou.

V roce 1991 se ústav přestěhoval do nových a větších prostor, které pro moderní výzkum nabízely lepší podmínky.

V roce 1992 došlo následkem rozpočtových omezení k výraznému snížení počtu zaměstnanců AV ČR. V důsledku toho byly zrušeny některé ústavy, včetně někdejšího Ústavu nukleární biologie a radiochemie v Praze. Výzkumná skupina stopové anorganické analýzy z tohoto ústavu se však stala samostatným pracovištěm Ústavu analytické chemie. Tato akce přinesla významnou změnu v rozsahu vědeckého programu ústavu a doplnila do něj některé vybrané metody atomové spektrometrie (do té doby se zabýval výhradně analytickými separacemi).

V roce 2001 byl výzkumný program ústavu dále rozšířen založením dvou nových výzkumných skupin zaměřených na miniaturizovanou instrumentaci a proteomiku, s důrazem na aplikace hmotnostní spektrometrie. V roce 2010 se obě oddělení sloučila do oddělení bioanalytické instrumentace.

Obrázek na obálce: „IEF slunce“ – stylizovaný záznam separace izoelektrickou fokusací 49 žlutých markerů založených na nitrofenolu a pokrývajících gradient pH od 3 do 10. Upraveno z originálu v článku F. Duša, D. Moravcová, K. Šlais: Low-molecular-mass nitrophenol-based compounds suitable for the effective tracking of pH gradient in isoelectric focusing. *Anal. Chim. Acta* 1076 (2019) 144–153

Využití nanočástic v analytické chemii

Oddělení bioanalytické instrumentace, Ústav analytické chemie AV ČR v. v. i.,
Veveří 97, 602 00 Brno

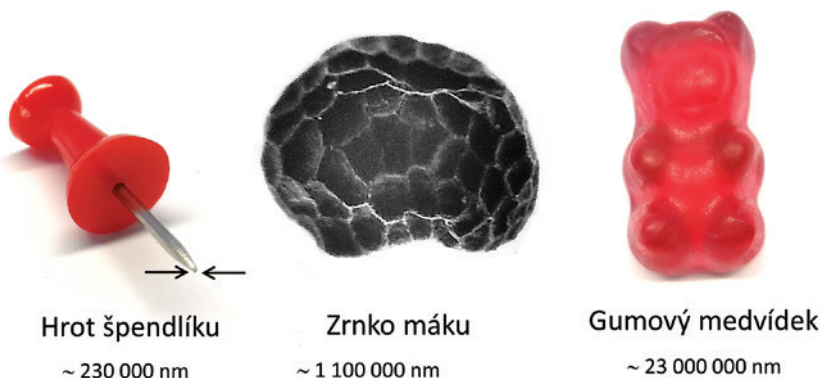
Jako nanočástici označujeme těleso, jehož alespoň jeden z rozměrů je v rozmezí 1–100 nm. Protože měřítka, na která jsme v běžném životě zvyklí, nás svazují v představách, bude pravděpodobně názornější přiblížit si daný rozměr na jednoduchém přirovnání. Uděláme-li tužkou tečku, která nemá v průměru ani jeden milimetr, vejde se do vzniklého prostoru přibližně 7 000 000 000 nanočástic. Na obrázku 1 jsou některé známé objekty s uvedenou velikostí v nm.

Podle předchozí definice do skupiny nanočástic spadá třeba i několikametrové vlákno s nanometrovým průměrem, stejně jako nanometrová kulička. Svět nanočástic je proto nesmírně rozmanitý. Rozdílné vlastnosti nanočástic nejsou ale ani zdaleka dány jen tvarem. Charakter jejich chování je ještě mnohem více ovlivňován materiálem, ze kterého jsou tvořeny. Z hlediska materiálu jsou patrně nejznámější zlaté nebo stříbrné nanočástice, používané již v minulosti například pro barvení skla. Existuje ale celá řada dalších kovů, ze kterých mohou být nanočástice vyrobeny, například měď, železo nebo lanthanoidy.

Cílená příprava nanočástic se tradičně opírá o dva rozdílné přístupy. Jeden z nich vytváří nanočástice z ještě menších komponent (atomů). Druhý se naopak zaměřuje na fragmentaci větší struktury v menší. Pro účely analytické chemie se spíše setkáváme s přístupem *bottom-up*, tedy chemické redukce kationtů kovů za vzniku nanočástic tohoto kovu. Pro přípravu zlatých a stříbrných nanočástic velmi často slouží jako vstupní surovina kyselina chlorozlatitá (HAuCl_4) a dusičnan stříbrný (AgNO_3) a tyto látky se nejčastěji vystavují působení citrátu sodného ve vroucí vodě (viz obr. 2).

Citrát zde působí jako redukční a stabilizační činidlo, nicméně jej lze nahradit i jinými redukčními činidly, například kyselinou askorbovou nebo borohydridem sodným. Stabilitu mohou podpořit ještě další činidla, například thiohy, aminy,

Obr. 1 Rozměry několika vybraných objektů v nanometrických jednotkách

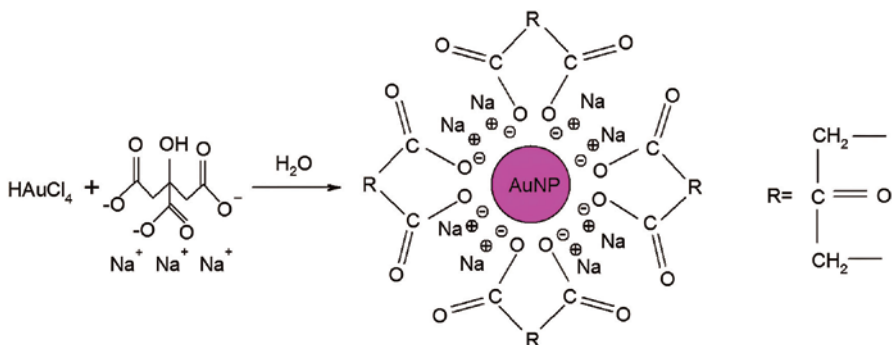


kyseliny nebo polymery. Nanočástice oxidů železa jsou syntetizovány precipitací, která je založena na reakci Fe^{2+} a Fe^{3+} iontů v molárním poměru 1:2 v alkalickém prostředí (amoniak, hydroxid sodný). Vysrážené nanočástice Fe_3O_4 nejsou za běžných podmínek příliš stabilní a snadno se oxidují vzduchem. Proto precipitační způsob syntézy vede ke směsi nanočástic Fe_3O_4 a Fe_2O_3 . Do reakční směsi jsou rovněž přidávány ionty citrátu, které elektrostaticky stabilizují vzniklé nanočástice v roztoku a zabráňují jejich agregaci do větších celků. Řada nanočástic je připravována za vysokých teplot, přičemž jsou vstupní látky přeměňovány na materiál nanočástic. Sem patří například syntéza nanočástic z oleátů lanthanoidů, která probíhá přibližně při teplotě 300 °C. Tyto nanočástice se nazývají foton-upkonverzní nanočástice. Vykazují zvláštní typ luminiscence – fotonovou upkonverzi –, tzn. pokud je vystavíme neviditelnému infračervenému záření, dochází k jeho absorpci a přeměně na viditelné záření (jedná se tedy o anti-Stokesovy značky). Obrovskou výhodou je, že změnami ve složení a koncentraci jednotlivých složek při syntéze foton-upkonverzních nanočástic můžeme cíleně měnit jejich luminiscenční vlastnosti a vytvářet si tak celé knihovny emisních spekter. Do trochu výjimečné kategorie spadá tvorba nanovláken, která se zpravidla připravují vytahováním polymerní směsi pomocí elektrického pole. Obecně platí, že pro nanočástice, které vzniknou redukcí z kationtů, není energeticky výhodné zůstat v této podobě a mají tendence vytvářet částice větší. Nejčastějším způsobem, jak zamezit vzájemnému kontaktu nanočástic (a tedy i jejich spojování) je přidavek nabitě látky, která se na nanočástice v průběhu syntézy naváže. Náboj, který se na povrchu nanočástice vytváří, pak odpuzuje ostatní stejně nabitě částice a systém je stabilní. Jinou možností je obalit nanočástice rozměrným polymerem, který svou strukturou znemožní, aby došlo k přímému kontaktu mezi kovovými nanočásticemi.

Významný rozvoj nanočástic a nanotechnologií přinesla zejména elektronová mikroskopie. Ta totiž umožňuje velmi detailně charakterizovat připravenou strukturu. V elektronové mikroskopii existují principiálně dva základní zobrazovací mechanismy. Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) pracuje s velmi tenkými vzorky, které jsou nanášeny na jemnou, zpravidla kovovou sítku. Detektor mikroskopu pak zachycuje elektrony procházející vzorkem a vyhodnocuje jejich intenzitu. Druhé možné uspořádání, skenovací elektronová mikroskopie (SEM), pracuje se zpětně odraženými elektrony nebo elektrony uvolněnými ze vzorku po interakci s příchozími elektrony. Takovéto vzorky musí být vodivé nebo vodivě pokryté. Vzorek se nanáší na nerezovou destičku označovanou jako terčík (obr. 3).

Na oddělení bioanalytické instrumentace se studiu vlastností a využití nanočástic v analytické chemii a příbuzných oborech věnujeme už celou řadu let. Postupně jsme vyvinuli a optimalizovali syntézu různých nanočástic, které jsou na oddělení využívány k rozličným analytickým účelům, například pro citlivou detekci molekul, koncentrování vybraných analytů a studium interakcí a možností stanovení biomolekul. Následující příklady ilustrují některé praktické aplikace nanočástic.

Zlaté nanočástice modifikované různými funkčními ligandy lze využít v analyticko-biochemických metodách. Jednou z nejpoužívanějších metod jsou tzv. imunochromatografické techniky, založené na interakci specifických protilátek s detekovaným analytem. Imunoanalýza s laterálním průtokem (LFIA) je oblíbenou technikou pro lékařskou diagnostiku v místě péče (například těhotenský test, test CRP) a kontrolu



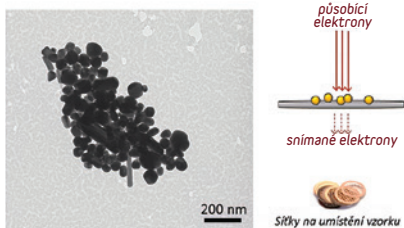
Obr. 2 Příklad syntézy zlatých nanočástic redukcí kyseliny chlorozlatité citrátem sodným [DOI 10.1002/elps.202200142]

potravin a léků, a to pro svou jednoduchost, nízkou cenu a možnost domácího použití. V neposlední řadě jsou na obdobném principu založeny i rychlé antigenní testy na covid-19, které detekují buď virovou RNA, nebo protilátky proti SARS-CoV-2. Zlaté nanočástice se také používají při analýze a stanovení koncentrace sloučenin obsahujících thiolové skupiny, protože jsou schopny spontánně vytvořit stabilní Au–S vazby. Biologické thiole, někdy označované jako biologické aminioli, jsou endogenní sloučeniny obsahující thiolovou (–SH) skupinu, která hraje významnou roli v biologických systémech. Příkladem může být glutathion, endogenní tripeptid, který se podílí na odstraňování reaktivních forem kyslíku a volných radikálů. Analýza biologických thiolů tak nachází široké uplatnění například při analýze životního prostředí, ale zejména v lékařských vědách.

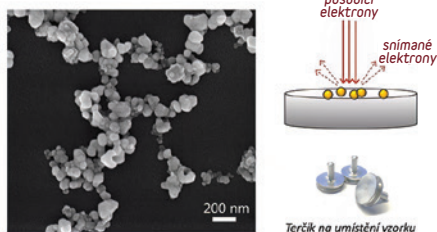
Stříbrné nanočástice stejně jako ty zlaté na první pohled zaujmou pozorovatele svým zbarvením. Zatímco pro zlaté nanočástice je typická vínově červená barva (dobře známá z domácích těhotenských či covidových testů), stříbrné nanočástice mají nejčastěji zbarvení žlutohnědé. Nicméně barva obou typů nanočástic je lehce ovlivnitelná jejich tvarem a velikostí, a je tedy možné připravit poměrně pestrou paletu zbarvení. V současnosti jsou nanočástice stříbra podstatně více zmiňovány v souvislosti se svými antibakteriálními a antivirozními vlastnostmi. Přestože

Obr. 3 Znázornění mechanismů transmisní a skenovací elektronové mikroskopie a příklad snímků shodných nanočástic stříbra při použití dvou různých typů elektronové mikroskopie

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)



Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)



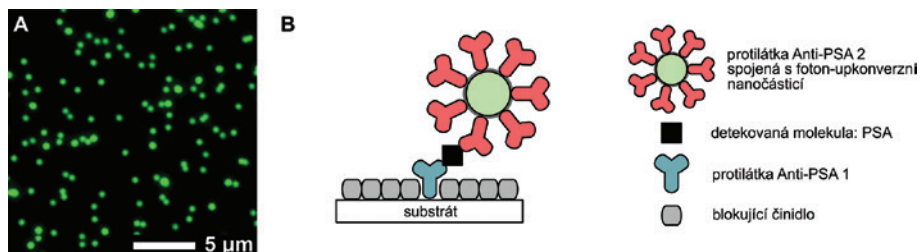
mechanismus tohoto účinku stále není plně objasněn, nejčastěji se antibiotický efekt přičítá poškození cytoplazmatické membrány stříbrnými kationty, které se ze stříbrných nanočástic pozvolna uvolňují. Popularita nanostříbra je na vzestupu především díky skutečnosti, že (až na velmi vzácné případy) si bakterie nejsou schopny vyvinout proti účinkům stříbra rezistenci, tak jak tomu bývá u tradičních léčiv. V analytické chemii jsou nanostruktury stříbra či zlata nezbytnou součástí tzv. povrchem zesílené Ramanovy spektrometrie. Tyto kovy napomáhají velmi citlivě zaznamenat fotony nesoucí informaci o pohybech atomů uvnitř molekuly. Protože tyto pohyby odrážejí molekulární strukturu, může nám zmiňovaná metoda pomoci odpovídat na jednu ze základních otázek analytické chemie – o jakou látku se jedná.

Nanočástice na bázi oxidů železa nebo hydroxyapatitu byly využity pro selektivní obohacení fosfopeptidů před jejich následnou analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. Samostatnou skupinu pak představují nanovláknové struktury, např. na bázi TiO_2 nebo ZrO_2 , které lze podobně využít pro selektivní zachycení fosfopeptidů. Ve srovnání s běžnými materiály na bázi kuliček vykazují nanovláknenné materiály mnohem vyšší permeabilitu, což umožňuje jejich použití v různém formátu bez potřeby aplikace vysokého tlaku.

Velikost některých molekul, jako jsou proteiny, je s velikostí foton-upkonverzních nanočástic srovnatelná, a tak je možné je použít k jejich značkování. Díky nízkému pozadí mohou být takto označené molekuly pozorovány dokonce jednotlivě, a to i s poměrně nenáročnou instrumentací. Tímto způsobem označené molekuly se uplatňují například v imunohistochemii, která umožňuje studium mikroskopické struktury živočišných tkání a rostlinných pletiv. Imunohistochemie umožňuje v mikroskopických preparátech specificky označit vybrané molekuly a pozorovat jejich prostorové rozložení. Podobně můžeme měřit i koncentraci molekul v imunochemických detekčních metodách (obr. 4).

V současné době se na oddělení využívá multiplexování v mikrofluidních experimentech, kdy s jeho pomocí můžeme označovat (kódovat) mikrokapkové reaktory. To umožňuje provádět velké množství například biochemických experimentů a vyhodnocovat jejich výsledky během zlomků vteřiny a například s využitím multiplexování s foton-upkonverzními nanočásticemi a automatizace na mikrofluidních čipech může být zlepšena detekce klinicky významných proteinových markerů.

Obr. 4 A – foton-upkonverzní nanočástice je snadné zobrazit v optickém mikroskopu jako malé tečky; B – toho lze využít v imunochemických metodách, kdy lze počítat přímo jednotlivé imunochemické komplexy; zde znázorněna detekce prostatického sérového antigenu, který je důležitým markerem rakoviny prostaty



Plně automatizovaná analýza suchých krevních skvrn pro personalizovanou medicínu

*Oddělení elektromigračních metod, Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.,
Veveří 97, 602 00 Brno*

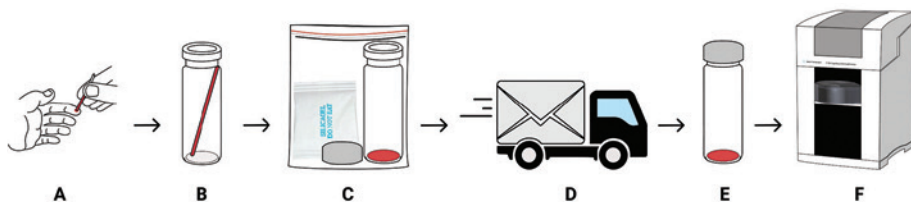
Poslední roky způsobily revoluční posun k vytváření co nejjednodušších, rychlých, levných a selektivních technik schopných diagnostikovat akutní onemocnění a významně se změnilo i vnímání široké veřejnosti a její ochota tyto přístupy akceptovat a používat. Ruku v ruce s tím se vyvíjela také technická řešení, díky nimž byla řada metod, dlouhá léta balancujících na hraně přežití, znovuzrozena a rozšířena do dalších oblastí. Jeden takový příběh zažila i technika odběrů, zpracování a analýzy suchých krevních skvrn, které představují vhodný nástroj pro zavedení a rozvoj personalizované medicíny.

V popředí zájmu klinické diagnostiky se drží zejména analýzy krve a moči. Spolu s vnějšími symptomy poskytuje analýza tělních tekutin ucelený pohled na zdravotní stav jedince a její výsledky umožňují zacílit klinickou diagnostiku. V současné době se klasická klinická diagnostika posouvá do oblasti tzv. personalizované medicíny neboli medicíny orientované na konkrétního jedince. V ní se zohledňuje jedincova unikátnost a jeho hodnoty pro standardní (zdravý) stav. Celková diagnostika je tak mnohem přesnější a rychlejší. Po diagnostice nastupuje léčba, která nemusí fungovat, pokud je léčebný proces nastaven „univerzálně“, dle zavedených zvyklostí. I v této fázi se ukazuje jako daleko účinnější, úspornější a šetrnější pro zdravotnický systém i jedince zohlednit znalost, potřeby, fyziologické i biochemické odchylky daného jedince a nastavit tak cílenou léčbu s ohledem na jeho unikátní parametry.

Snahy o zvyšování pohodlí vyšetřovaného jedince a zefektivnění nákladů vynaložených na přesné cílení diagnostiky a léčby doprovází snaha o snížení frekvence vyšetření a zákroků, náhrada invazivních vyšetření méně bolestivými a multikomponentní vyšetření, při kterých se z jednoho vzorku získá více klinických informací. Všechny tyto snahy překvapivě urychlila nedávná situace vzniklá v důsledku pandemie způsobené onemocněním covid-19. Při ní došlo k izolaci jedinců do domácností, snížení frekvence návštěv v klinických centrech a vyloučení přímého kontaktu se zdravotnickým personálem. Současně byl také urychlen vývoj odběrových metod a diagnostických postupů, nejen tzv. nástrojů *point-of-care* diagnostiky (určené pro použití v místě péče o jedince), které toto umožňovaly. Velká část zodpovědnosti za odběry vzorků i jejich vyhodnocení byla přenesena na jedince samotného a toto bylo širokou veřejností akceptováno. Vzniklá situace umožnila vývoj širokého spektra diagnostik, které mají komplexnější proces zpracování, jsou jednodušší, rychlejší, levnější a využívají alternativní biologické vzorky. Vědečtí pracovníci našeho oddělení se proto snaží řešit většinu výše psaných výzev z pohledu zefektivnění odběrů vzorků, jejich automatizovaného zpracování i automatizované analýzy.

Jak analytická chemie přispívá k současným trendům v klinické diagnostice?

Úloha analytické chemie spočívá ve vývoji a zjednodušování analytických nástrojů a postupů, které zahrnují odběr i skladování vzorků až po jejich úpravu a analýzu.



Obr. 5 A – samoodběr krevního vzorku, B – absorpce krve savým materiálem, C – sušení krve, D – transport vzorku do laboratoře, (E a F) – vložení do analytického přístroje [doi.org/10.1002/anie.202012997]

Schéma zjednodušeného procesu, který je uveden na příkladu odběru a analýzy suché krevní skvrny, je zachyceno na obrázku 5.

Samotná práce s žilní krví je problematická od odběru přes transport až po analýzu. Jednou z alternativ umožňující výrazně jednodušší odběry krve, která se díky tomu dostala do popředí aktuálního zájmu klinické analytické chemie, je technika suchých krevních skvrn. Ta perfektně splňuje požadavky na vyšší pohodlí jedince při odběrech, zjednodušení procesu zdravotnické diagnostiky, personalizaci medicíny a snížení nákladů na odběr biologických vzorků. Současný rozvoj analytických technik nově také umožňuje vhodné zpracování a analýzu suchých krevních skvrn.

Oproti bolestivým odběrům a náročnému transportu/zpracování žilní krve nabízí technika suchých krevních skvrn výrazně méně invazivní odběry mikrolitrových množství kapilární krve po provedení miniaturního vpichu do bříška prstu či paty. Odběr suchých krevních skvrn je tak téměř bezbolestný, zajišťuje nízkou míru rizika infekce, nenáročnost na zdravotnické pomůcky a zaškolení personálu. Kapka krve je absorbována savým materiálem, na kterém následně zaschne. Situaci zachycuje obrázek 6. Takto vytvořený vzorek je nereaktivní, zdravotně nezávadný, vhodný ke snadnému transportu (osobní doručení, odeslání běžnou poštou, balíčkem),

Obr. 6 Odběr kapilární krve a správné plnění definovaných oblastí pro suché krevní skvrny



může být skladován při pokojové teplotě a má delší životnost pro zpracování (dny až měsíce).

I přes mnohé výše popsané výhody představuje analýza suchých krevních skvrn také mnohé výzvy, zahrnující jak vlastní analýzu (automatizace úpravy a analýzy vzorku), tak i klinickou diagnostiku (rozdílné složení kapilární a žilní krve). Analytická část je předmětem aktuálního výzkumu na našem oddělení, kde se intenzivně věnujeme zefektivnění samotné úpravy a analýzy suchých krevních skvrn.

Před vlastní analýzou je potřeba suchou krevní skvrnu vyrazit z odběrové karty, manipulovat s ní a zpracovat ji elučními rozpouštědly. Manuální zpracování zpravidla zahrnuje řadu kroků (plnění rozpouštědly, jejich přenos, odpaření a rekonstituci) se značným rizikem nepřesností a chyb. Vzhledem k velkým dávkovacím objemům v běžných analytických přístrojích (řádově v desítkách mikrolitrů u klasické kapalinové chromatografie) tak množství vzniklého eluátu nemusí postačovat na opakované analýzy. Také v případě poloautomatických analyzátorů suchých krevních skvrn se objevuje řada nevýhod, které jsou aktuálně v popředí zájmu.

Nedávný výzkum na našem oddělení ukázal, že účinnou instrumentací pro analýzu a překvapivě i samotné zpracování suchých krevních skvrn může být kapilární elektroforéza. Ta je jako analytický nástroj běžně zavedenou separační technikou, jejíž výhody jsou velmi často přehlíženy. Nicméně právě v oblasti analýz malých množství vzorků se ukázala být výhodnější, a navíc díky svému instrumentálnímu uspořádání (vnitřnímu systému na manipulaci s kapalinami) může sloužit i k přípravě vzorků. Možnost analýz více analytů současně ve velice krátkém čase umožňuje získat více analytických informací, zpřesnit kvantitativní vyhodnocení a snížit čas i náklady na multikomponentní analýzu.

Jaké konkrétní přístupy zpracování suchých krevních skvrn realizujeme na našem oddělení?

Při běžném odběru (přiložení kapky krve k savému materiálu) nelze určit přesný objem odebraného vzorku krve, tím pádem je následná analýza vzorku vhodná pouze pro screeningové a porovnávací testy, aniž by bylo možné stanovit přesné koncentrace analytů. Na našem oddělení jsme vypracovali jednoduchou metodu pro přesnou kvantitativní analýzu suchých krevních skvrn, která je založena na automatickém stanovení původního objemu vzorku krve i přesné koncentrace biomarkerů. Kapilární elektroforéza umožňuje stanovení základních anorganických iontů (např. sodíku a draslíku) souběžně s cílovými analyty (např. aminokyselinami jako biomarkery dědičných metabolických poruch) v rámci jediné analýzy. Zmíněné anorganické ionty mají v krvi běžné populace stabilní koncentrace a jsou tak přirozenými vnitřními standardy. Analýzou a kalibrací na anorganické ionty v krvi je možno určit, jaké množství krve vytvořilo suchou krevní skvrnu, a tím i stanovit přesné koncentrace aminokyselin v ní. Obecně lze tento koncept použít i ke stanovení dalších endogenních biomarkerů či exogenních analytů.

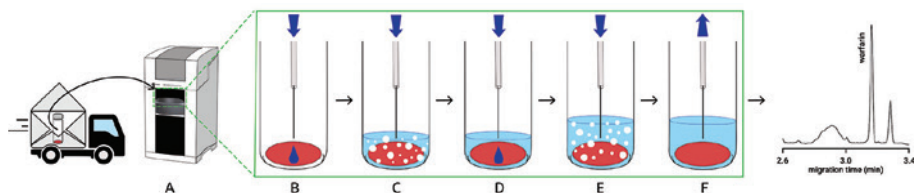
Při klasickém manuálním zpracování jsou ke krevní skvrně v odběrové nádobce přidány eluční roztoky a následně je vše promícháno na třepačce. Značnou výhodou přístroje pro kapilární elektroforézu je jeho schopnost manipulace s kapalinami, protože všechny tyto úkony může plně automatizovaně provádět jeho vnitřní tlakový systém. Tato plně autonomní příprava a následná analýza suchých krevních

skvrn pomocí kapilární elektroforézy může být využita například pro terapeutické monitorování léčiv. V něm jde, hlavně v počáteční fázi léčby, o správné nastavení terapeutické koncentrace léčiva a sledování jeho hladiny v krvi. Pacient je tak nucen v počátku léčby pravidelně a často docházet do klinických center na odběry žilní krve.

Při terapeutickém monitorování léčiv by tedy mohlo být výhodné použít suché krevní skvrny, protože ty umožňují snadné samoodběry kapilární krve pacientem v pohodlí domova přímo do odběrových nádobek, které lze následně zaslat poštou do laboratoře k automatizované analýze. Příkladem může být léčivo warfarin, určené pro léčbu přílišné srážlivosti krve, ale obecně lze tento koncept použít pro libovolná klinicky významná léčiva či analyty. Koncept navržený na našem oddělení využívá princip znázorněný na obrázku 7. Suchá krevní skvrna je vytvořena přímo v odběrové nádobce, kterou je vialka kompatibilní s autosamplerem komerčního přístroje pro kapilární elektroforézu. Po vložení vialky se suchou krevní skvrnou do autosampleru do ní přístroj nadávkuje skrz tenkou kapiláru požadované množství elučních rozpouštědel, výsledný eluát promíchá a nakonec i analyzuje. Veškeré úkony probíhají s využitím jediného přístroje a jediné kapiláry. Takto je možno zpracovávat desítky vzorků bez jakéhokoliv zásahu obsluhy a navržený koncept může významně snížit zátěž jak pro pacienty a zdravotnický personál, tak i pro personál v klinických laboratořích.

V moderní klinické medicíně by měla být upřednostňována preventivní diagnostika před léčbou následků onemocnění. Ve většině případů tomu tak není a léčba začíná až po rozvinutí nemoci a objevení chronických příznaků. Mezi důvody zabráňující většímu rozšíření preventivní diagnostiky patří vysoké ceny analýz, vysoké náklady na odběr krevních vzorků a neochota populace podstupovat preventivní odběry žilní krve. Technika samoodběrů kapilární krve eliminuje řadu těchto nedostatků a ve spojení s automatizovanou úpravou a analýzou suchých krevních skvrn, vyvinutou na našem oddělení, by bylo možné provádět plošné testování celé populace s relativně jednoduchou dostupností vzorků i provedením až několika set analýz za den pomocí jediného analytického přístroje. Jako příklad využití můžeme uvést kyselinu močovou (způsobující dnu), jejíž zvýšené koncentrace v krvi se projevují bolestivostí kloubů. Toto onemocnění není standardně diagnostikováno v rámci běžné preventivní péče (na rozdíl od hladiny cukru a cholesterolu) a jeho léčba většinou začíná až po rozvinutí nemoci a chronických projevů. Dalším příkladem je kreatinin, jehož vyšší koncentrace v krvi poukazuje na zhoršenou funkčnost

Obr. 7 Po transportu vzorku do laboratoře a vložení vzorku do přístroje (A) přeneseme přístroj ke krevní skvrně definovaný objem prvního rozpouštědla a promíchá ho (B a C), přeneseme definovaný objem druhého rozpouštědla a opět ho promíchá (D a E) a poté nadávkuje (F) a analyzuje výsledný eluát [doi.org/10.1002/anie.202012997]



ledvin a je stanovován pouze na doporučení lékaře. Stejně lze tento koncept využít ke stanovení mnoha biomarkerů pro jednoduchou preventivní diagnostiku dalších závažných onemocnění.

Náš budoucí výzkum je proto zaměřen na zdokonalení těchto konceptů. Ty reflektují i aktuální všeobecné trendy, kdy po jednoduchém odběru, úpravě a analýze vzorku následuje zpracování analytické informace lékařem a léčba pacienta na dálku (tzv. telemedicína s využitím chytrého telefonu, e-mailu, e-receptu). Celý koncept tak nejenom minimalizuje vliv lidského faktoru na analýzu krve, ale současně pro pacienty eliminuje nutnost docházet k pravidelným odběrům a konzultacím. Širší využití tohoto konceptu je však podmíněno změnou přístupu celé společnosti a hlavně její ochotou k samoodběrům biologických vzorků a telemedicině. Tato ochota, poprvé výrazně zaznamenaná během nedávné pandemie, je proto důležitým příslibem pro budoucnost personalizované medicíny. Že to je možné, je vidět na příkladu metody původně vyvinuté v šedesátých letech minulého století pro screeningovou diagnostiku fenylketonurie, založené na technice suchých krevních skvrn, která se v posledních letech značně rozrostla a vydobyla si opětovnou pozornost.

Izoelektrická fokusace

Oddělení separací v tekutých fázích, Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 97, 602 00 Brno

Izoelektrická fokusace je metoda analýzy proteinů, peptidů a dalších látek, jejíž vývoj má v Ústavu analytické chemie AV ČR v Brně významnou tradici. Tato analýza probíhá na pozadí tzv. pH gradientu (postupně se zvyšující pH napříč separačním prostorem) a v ustáleném stavu se látky ze zkoumaného vzorku soustředí v pozici, kde lokální hodnota pH odpovídá jejich izoelektrickému bodu (viz níže). Izoelektrická fokusace může být realizována v různých tvarech separačního prostoru, například v křemenných kapilárách, v loži z netkané textilie, v plastovém kanálku naplněném gelem nebo na speciálně navrženém separačním čipu.

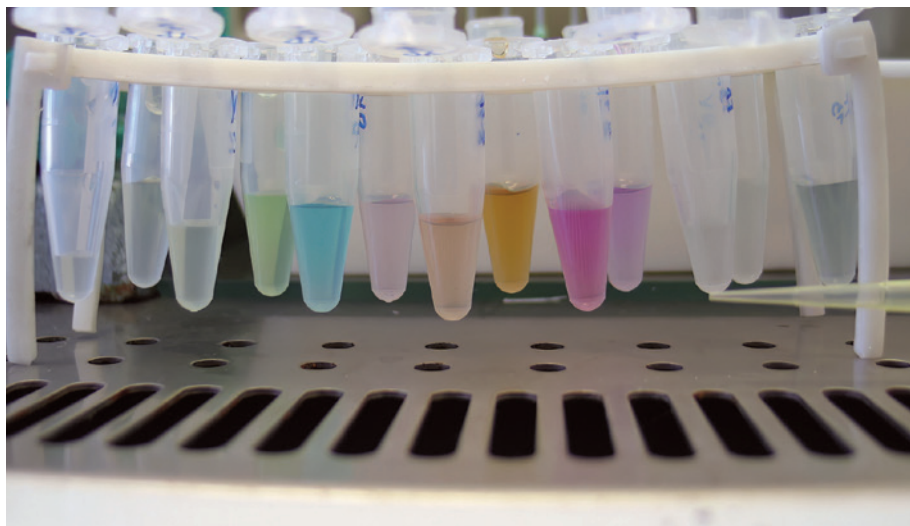
Látky analyzované pomocí izoelektrické fokusace musejí mít charakter amfolytu. Amfolyty jsou podskupinou amfoterních látek (látek schopných vystupovat v roztoku jako kyselina i jako zásada) a ve své struktuře mají jak kyselé, tak i bazické funkční skupiny. Tyto skupiny pak amfolytům v závislosti na pH roztoku umožňují změnu celkového náboje molekuly od záporného přes nulový až po kladný. Tato vlastnost je charakteristická například pro aminokyseliny. Peptidy a proteiny, které jsou složeny z aminokyselin, jsou také amfolyty. Amfolyty jsou také charakteristické přesně danou hodnotou pH, při které mají celkový náboj roven nule. Této hodnotě se říká izoelektrický bod a je jedinečný pro každou danou strukturu amfolytu. Například u proteinů je dán nejen výskytem jednotlivých druhů aminokyselin, ale i jejich pořadím v řetězci. V organismu jsou navíc proteiny často modifikovány dalšími funkčními skupinami (glykosylace, fosforylace atd.), zajišťujícími například aktivaci enzymu nebo rozpoznání proteinu jinými strukturami, případně určujícími prostorové umístění v buňce. Jelikož je většina těchto modifikací zajišťována nabitými skupinami, má každá takto modifikovaná struktura proteinu rovněž vlastní unikátní izoelektrický bod, odlišný od původního nemodifikovaného proteinu.

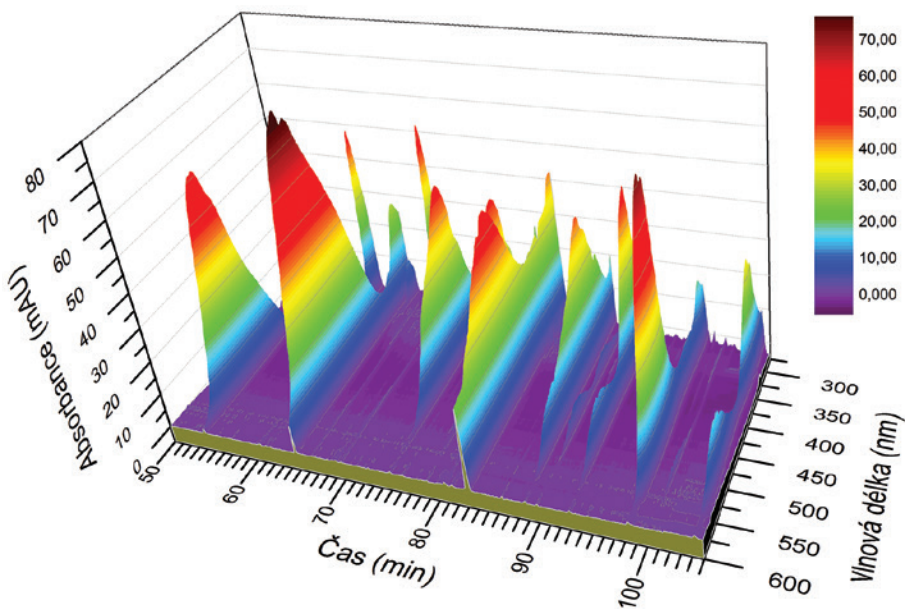
Izoelektrická fokusace je metoda vyvinutá pro rozdělení látek s odlišnými izoelektrickými body. První část názvu metody tedy přímo souvisí s unikátním izoelektrickým bodem každé analyzované látky. Slovo fokusace (z anglického *focusing* čili soustředění se na jedno místo) pro změnu souvisí s průběhem samotné analýzy. Základní podmínkou pro separaci je vytvoření tzv. pH gradientu. V principu jde o to, že se v roztoku po délce separačního prostoru kontinuálně mění pH od kyselého po zásadité. V elektrickém poli se pak v tomto pH gradientu pohybují amfolyty a soustředí („fokusují“) se v místě, kde pH odpovídá jejich izoelektrickému bodu. Hotová separace je pak signalizována vytvořením jednotlivých zkoncentrovaných zón všech amfolytů obsažených ve vzorku. Nejdůležitější skupinou látek, pro které je tato separační metoda vhodná, jsou proteiny, peptidy a jejich směsi, ale touto metodou je možné separovat i celé buňky.

Na našem ústavu vyvíjíme jak jednotlivé varianty separačních metod založených na izoelektrické fokusaci, tak i speciální barevné sloučeniny pro přesný popis (trasování) pH gradientu, tzv. markery izoelektrického bodu. Tyto markery mají jedinečnou schopnost přesně určit pH v místě, kde se marker nachází. Díky jejich unikátní barevnosti máme pak možnost na vlastní oči sledovat, jak se v průběhu analýzy jednotlivé markery oddělují ze směsi a fokusují do svých pozic (viz obr. 8). Nejen že sledovat průběh analýzy je velmi ilustrativní a edukativní, ale zároveň to umožňuje i rychlou a průběžnou úpravu nastavení parametrů separace pro dosažení co nejlepších výsledků.

Vývoj v oblasti těchto markerů na našem ústavu zosobňoval doc. RNDr. Karel Šlais, DrSc. Ve spolupráci s prof. RNDr. Zdeňkem Friedlem, CSc., z nedaleké Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně navrhli a syntetizovali první varianty

Obr. 8 Ukázka separovaných frakcí po preparativní izoelektrické fokusaci se separovanými markery izoelektrického bodu





Obr. 9 3D elektroferogram – spektrální záznam separace barevných (pI 10,27; 8,85; 7,34; 6,58; 6,22; 5,52; 4,93; 4,14; 3,44) a UV absorbujících (pI 9,47; 8,18) pI markerů pokrývajících pH gradient od 10 do 3 (od zásaditého pH vlevo až po kyselý pH vpravo)

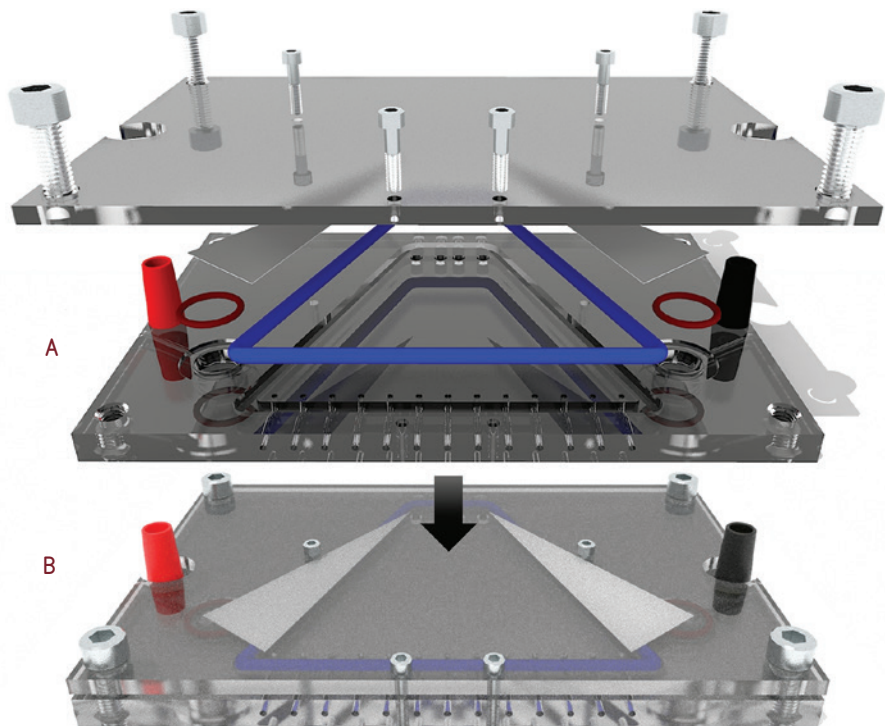
těchto látek a otestovali jejich funkčnost. První generace markerů vyvinutých v devadesátých letech byla založena převážně na modifikovaných nitrofenolech (viz obr. 9). Využití nitrofenolů jako základní struktury zapříčinilo barvu v různých odstínech žluté až oranžové. Následovaly další dvě dekády vývoje barevných markerů, později už pouze v rámci týmu doc. Karla Šlaisa. Postupně byly vyvinuty látky dalších barev (viz obr. 8), a dokonce látky fluoreskující při různých vlnových délkách. To umožnilo značení pH gradientu v mnoha rozličných metodách a rozšířilo vědeckou spolupráci při používání vyvinutých markerů nejdříve v rámci Evropy a následně i celosvětově. Díky jejich relativně levné syntéze bylo navíc možné markery použít i v preparativních analýzách. V takových analýzách by jinak bylo využití proteinových nebo peptidových markerů (jako jejich hlavní alternativy) velice drahé z důvodu velkého požadovaného množství a nepraktické z důvodu nízkého počtu dostupných barevných proteinů.

Vývoj preparativních metod izoelektrické fokusace má také dlouhou tradici v rámci oddělení separací v tekutých fázích a tento vývoj je rovněž těsně svázán s vyvinutými barevnými markery. Jde především o separační metody v plochých separačních kanálech, případně v separačním prostoru z porézních materiálů, umožňující kontinuální separaci vzorku (tj. stálé dávkování vzorku na začátku separačního prostoru a průběžné odebírání rozseparovaných frakcí na jeho konci). Tyto metody umožnily zpracovat i vzorky o velkém objemu a koncentrovat v nich

nejen proteiny a peptidy, ale rovněž i některé viry, bakterie a kvasinky. Separace mikroorganismů je velmi ceněná především z důvodu možnosti jejich následné detekce a identifikace bez aplikace mnohdy zdoluhavých mikrobiologických metod. Díky těmto nově vyvinutým metodám se podařilo navázat spolupráci s odborníky v mikrobiologii a v rámci ní řešit projekty pro detekci patogenních mikroorganismů. Mezi nejnovější trendy zde patří vývoj nových zařízení pomocí aditivní výroby zahrnující tvorbu prostorových modelů a následný 3D tisk prototypů těchto zařízení (viz obr. 10).

Opakem preparativních metod jsou metody pracující s objemy v řádu mikrolitrů až nanolitrů. Mezi ně se řadí i kapilární izoelektrická fokusace, která se na našem oddělení rozvíjela souběžně s preparativními metodami, především pod taktovkou Ing. Marie Horké, CSc. V této metodě se využívají křemenné kapiláry o délce několika desítek centimetrů, ale s vnitřním průměrem pouhých 50–100 mikrometrů (ekvivalent šířky lidského vlasu). V takové kapiláře jsme pak schopni dosáhnout mnohem vyšších separačních účinností, což nám umožní rozlišit i izoformy jednotlivých proteinů (lišící se i pouze jedinou změněnou aminokyselinou v celém řetězci

Obr. 10 IEF čip: zařízení pro kontinuální separaci mikroorganismů v A) rozloženém a B) sestaveném stavu; vzorek mikroorganismů je dávkován horními otvory spolu s pracovními roztoky a separované frakce jsou odebírány pomocí hadiček ústících z dolních odběrných kanálků



několika desítek či stovek aminokyselin) či některé fenotypy buněk stejného druhu (např. spora vs. aktivní buňka) nebo buňky rozdělit podle jejich aktuální kondice. Vývoj těchto metod je velmi důležitý i s ohledem na nedávnou pandemii a na časté zmínky o biologických zbraních, které se bohužel v posledních letech objevují. V obou případech hrají hlavní úlohu lidské patogeny. V rámci vývoje náš tým stále pracuje na vylepšení jak samotné separační metody, tak i následné detekce, což ve výsledku umožní rychlou a přesnou identifikaci mikroorganismů. Takto rychle získané informace o druhu mikroorganismu pak mohou významně posloužit bezpečnostním či zdravotnickým složkám při ochraně našeho i jejich vlastního zdraví.

Akumulace nanočástic a kovů v orgánech experimentálních zvířat

Oddělení analytické chemie životního prostředí, Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., Veveří 97, 602 00, Brno

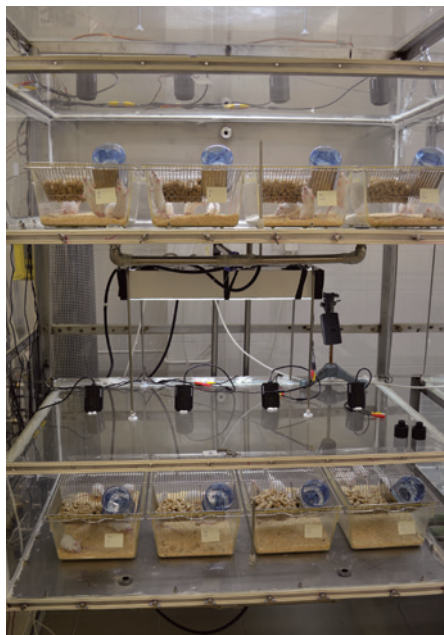
Epidemiologické studie dlouhodobě potvrzují významný vztah mezi obsahem atmosférických aerosolů a jejich škodlivými dopady na lidské zdraví. Vysoké koncentrace aerosolů mohou způsobit vznik astmatu, alergií, snížené funkce plic, respiračních, kardiovaskulárních a dalších chorob, což v konečném důsledku může vést ke zvýšené úmrtnosti. V současné době je potvrzeno, že negativní účinky aerosolů na zdraví závisí významně nejen na jejich koncentraci, ale i na velikosti a chemickém složení částic aerosolu. Velikost částic aerosolu, které se nacházejí ve vzduchu, se pohybuje v rozmezí 1 nm – 100 μm. Průměr částice určuje dobu jejího setrvání ve vzduchu a je rozhodujícím faktorem pro vstup do organismu a místo ukládání v dýchací soustavě. Čím jsou částice menší, tím hlouběji pronikají do dýchací soustavy, kde může dojít k jejich lokální depozici. Částice menší než 10 μm (označované také jako PM₁₀) pronikají při dýchání do dolních dýchacích cest, zatímco jemné částice (< 2,5 μm, PM_{2,5}) pronikají do průdušek a submikrometrové částice (< 1 μm, PM₁) až do plicních sklípků. Potenciálně nejnebezpečnějšími pro lidské zdraví jsou ultra jemné částice (< 100 nm), které pronikají hluboko do plicních sklípků. V posledních desetiletích se v souvislosti s rozvojem nanotechnologií začal pro částice menší než 100 nm používat alternativní název nanočástice (*nanoparticles*; NPs), které jsou definované jako částice, jejichž všechny vnější rozměry jsou rovny nebo menší než 100 nm. Potenciální nebezpečí NPs a ultrajemných částic pro lidské zdraví, na rozdíl od částic větších než 100 nm, souvisí zejména s možností jejich snadného průniku přes stěnu plicních sklípků (plicní epitel) do krevního systému a krev pak transportuje tyto částice do dalších orgánů. Po proniknutí do krevního řečiště vyvolávají NPs a ultrajemné částice zánětlivé procesy, které mohou být následně provázeny kardiovaskulárními problémy, neurodegenerativními a nádorovými změnami a dalšími zdravotními problémy.

V praxi se aktuálně termín „ultrajemné částice“ používá výhradně pro částice běžně se vyskytující ve vzduchu jako přirozená součást atmosférických aerosolů vznikajících běžnými přírodními procesy, jako jsou lesní požáry, sopečná činnost nebo nukleární reakce plynných prekurzorů. Termín „nanočástice“ se používá pro polydisperzní částice s komplikovaným chemickým složením neúmyslně produkované

jako vedlejší produkty automobilovou dopravou, v průmyslu, spalováním dřeva a uhlí v rámci vytápění domácností a dalšími lidskými aktivitami (tzv. antropogenní NPs) nebo pro záměrně vyrobené, většinou monodisperzní částice s přesně definovanými chemickými a fyzikálními vlastnostmi pro cílenou aplikaci (tzv. *engineered* NPs, eNPs). K nejčastějším představitelům eNPs, se kterými se běžně setkáváme v normálním životě, případně v pracovním prostředí, patří nanočástice kovů. Nanočástice železa, stříbra, titanu a zinku a jejich vliv na zdraví lidí a dalších živých organismů jsou v současné době předmětem intenzivního studia, na rozdíl od nanočástic toxických kovů, jako je kadmium a olovo, které jsou na okraji zájmu vědecké komunity.

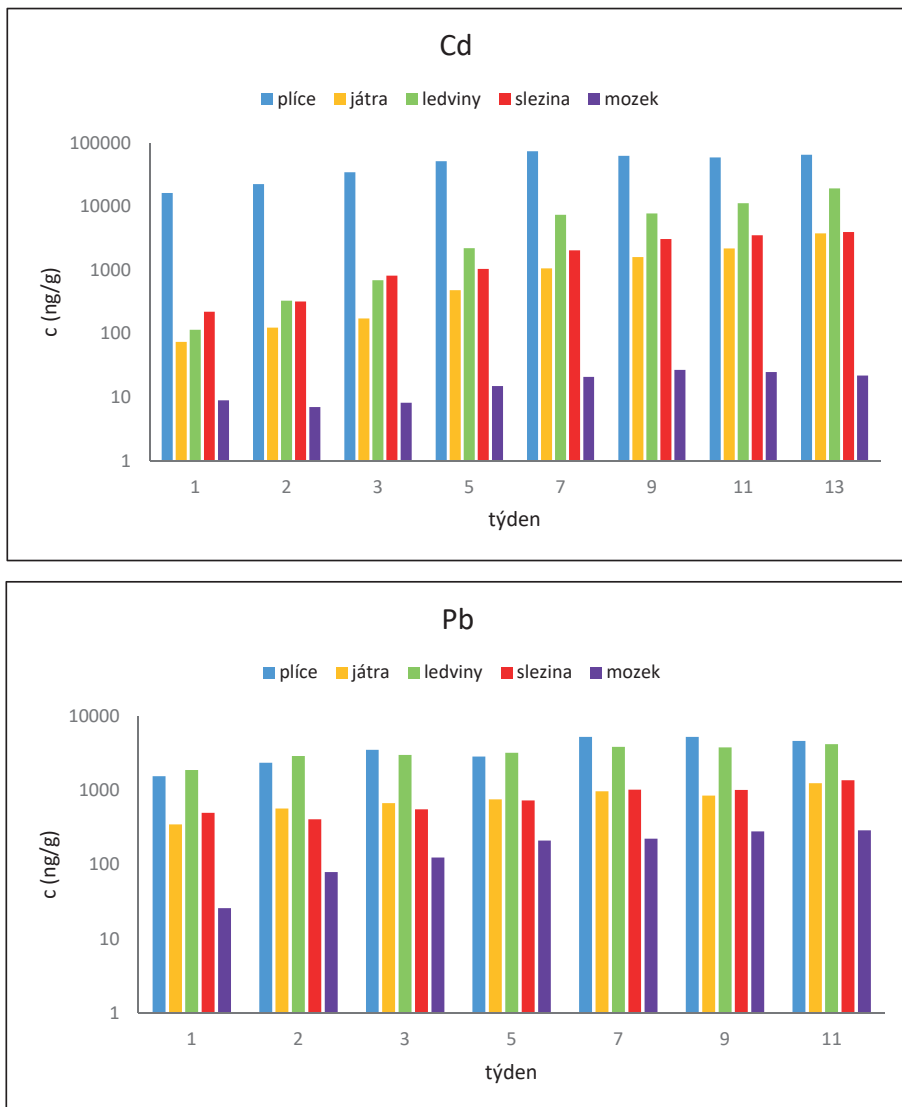
Záměrná výroba eNPs se speciálním složením a vlastnostmi v posledních desetiletích neustále roste. Tyto eNPs nacházejí uplatnění v mnoha oblastech, jako je elektronika, produkce energie, biotechnologické procesy, ale i v medicíně, farmacii, potravinových doplňcích, kosmetice, barvivech, bateriích, dopravě, domácnostech atd. Paralelně s rostoucí výrobou a rozšiřujícími se aplikacemi eNPs vzrůstá i počet vědeckých studií zabývajících se detailní charakterizací jejich vlastností a toxicity v souvislosti s jejich potenciálními negativními dopady nejen na lidské zdraví, ale i na životní prostředí. V současné době přesto máme stále jen velmi málo informací o základních mechanismech zodpovědných za toxické působení eNPs na živé organismy včetně člověka. Mezi vědeckými studiemi zabývajících se studiem vlivu eNPs na lidské zdraví stále i v současné době převažují *in vitro* testy, kdy je sledován vliv

Obr. 11 Inhalační komory s ochrannou konstrukcí v laboratoři ÚIACH



eNPs na lidské nebo zvířecí buňky v kontrolovaných laboratorních podmínkách. Hlavní nevýhodou *in vitro* experimentů je to, že nejsou schopny poskytnout komplexní informaci o interakci mezi buňkami a biochemických procesech, ke kterým dochází během metabolismu. V *in vivo* experimentech je naopak vliv eNPs testován přímo na živých organismech (nejčastěji na laboratorních zvířatech), kdy reálné

Obr. 12 Akumulace Cd a Pb ve vybraných orgánech myši při dlouhodobé expozici CdO a PbO eNPs



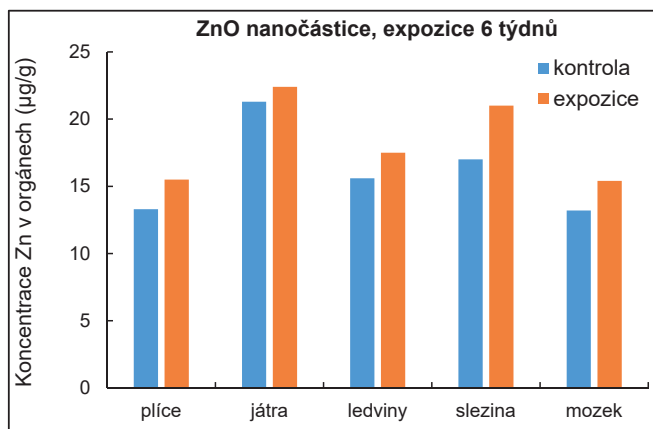
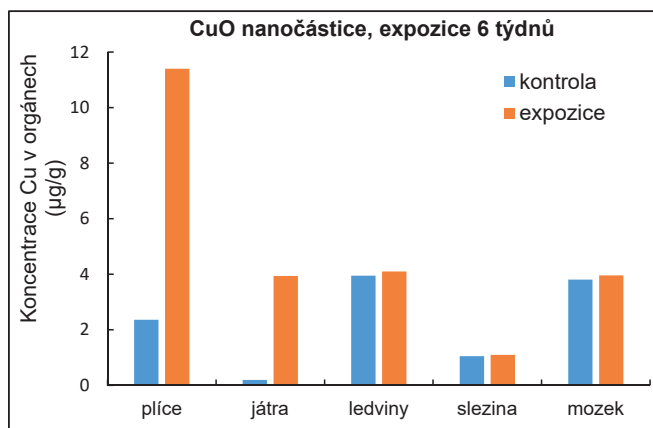
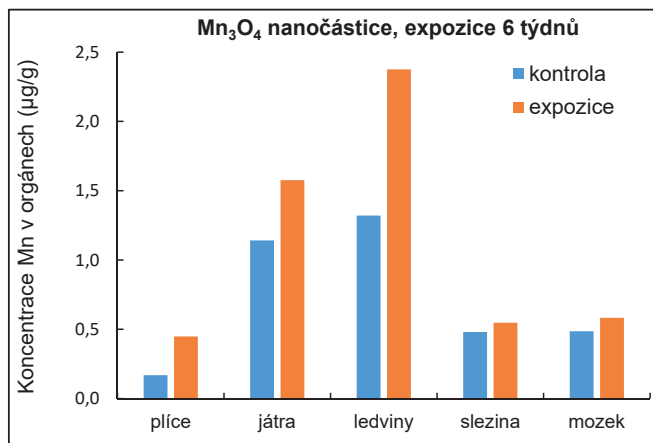
expoziční trasy umožňují přesnější vyhodnocení celkového vlivu eNPs (včetně jejich toxicity) na živý organismus.

NPs mohou vstoupit do organismu několika cestami, např. poškozenou kůží, trávicím traktem v rámci příjmu potravy, čichovým epitelem v nosní dutině, kudy NPs pronikají přímo do mozku, ale zdaleka nejčastější a nejdůležitější cestou je inhalace, kdy NPs při dýchání vstupují nosem či ústy přímo do dýchací soustavy. Pro napodobení podmínek reálné expozice lidské populace nanočásticím ve volném ovzduší se v oddělení analytické chemie životního prostředí Ústavu analytické chemie AV ČR již více než 10 let provádí inhalační experimenty s laboratorními zvířaty. Jako modelová zvířata jsou používány samice myši, které inhalují eNPs obsahující oxidy jak toxických kovů (kadmium a olovo), tak i relativně netoxických a zároveň široce používaných kovů, jako jsou Ti, Zn, Cu a Mn. Inhalační experimenty probíhají ve speciální laboratoři obsahující 4 inhalační komory (obr. 11), v nichž jsou myši vystaveny cílenému působení eNPs za podmínek fyziologické expozice podobné reálným podmínkám v znečištěném ovzduší. Uvnitř každé inhalační komory jsou čtyři menší plastové boxy, ve kterých se nachází experimentální zvířata. Tyto komory jsou z bezpečnostních důvodů odděleny od zbytku laboratoře ochrannou konstrukcí zhotovenou ze skla a nerezového materiálu a celý systém umožňuje provádět dlouhodobé inhalační pokusy s eNPs.

Při inhalačních experimentech samice myši inhalovaly eNPs kontinuálně po dobu 6, 11 nebo 13 týdnů (24 hodin denně, 7 dní v týdnu). Ve vybraných časových intervalech byly myši postupně odebírány, humánně usmrčeny a vybrané orgány byly analyzovány na obsah kovů z inhalovaných eNPs. Pro studium akumulace eNPs a kovů v těle laboratorních myši bylo vybráno 5 orgánů: plicé, játra, ledviny, slezina a mozek.

Časový průběh nárůstu koncentrace Cd a Pb v plicích jako vstupním orgánem a v dalších orgánech během dlouhodobé expozice myši eNPs CdO (13 týdnů) a PbO (11 týdnů) je znázorněn na obr. 12. Uvedené výsledky potvrzují postupnou akumulaci obou kovů ve všech studovaných orgánech exponovaných myši. Na základě informací získaných v průběhu experimentů předpokládáme, že část CdO a PbO eNPs deponovaných na povrchu plicního epitelu se postupně rozpouští v plicním surfaktantu za vzniku ionizovaných forem Cd a Pb, které po přechodu do krevního oběhu jsou společně s nerozpuštěnými nanočásticemi transportovány krví z plic do celého těla. Zbytek deponovaných eNPs je z plicních sklípků odstraněn působením alveolárních makrofágů. Následně jsme inhalační experimenty provedli i s eNPs Mn_3O_4 ($\text{MnO} \times \text{Mn}_2\text{O}_3$), CuO, ZnO a TiO_2 . Kadmium a olovo jsou pro živé organismy toxické, oba kovy jsou považovány za potenciální karcinogeny a v orgánech se běžně nevyskytují, zatímco Mn, Cu a Zn, tzv. stopové esenciální prvky, jsou důležitou součástí mnoha různých enzymů a bílkovin a podílí se tak na průběhu životně důležitých metabolických procesů v živých organismech. Z tohoto důvodu se Mn, Cu a Zn přirozeně vyskytují v orgánech myši v poměrně vysokých koncentracích. Koncentrace Mn, Cu a Zn v orgánech myši exponovaných po dobu 6 týdnů Mn_3O_4 , CuO a ZnO eNPs jsou na obr. 13 porovnány s koncentracemi v orgánech kontrolních myši, které celou dobu dýchaly čistý vzduch bez eNPs.

Je zřejmé, že šestitýdenní inhalace eNPs oxidů toxického kadmia i olova vedly k významnému nárůstu koncentrace Cd i Pb ve všech studovaných orgánech



Obr. 13 Koncentrace Mn, Cu a Zn v orgánech kontrolních a exponovaných myší na konci 6. týdne expozice eNPs

exponovaných myší, zatímco inhalace eNPs oxidů Mn, Cu a Zn vedla jen k nepatrnému nárůstu koncentrace příslušného kovu v orgánech exponovaných myší (s výjimkou Cu v plicích a játrech) v porovnání s koncentracemi těchto kovů v orgánech kontrolních myší. Koncentrace titanu ve všech orgánech exponovaných myší s výjimkou plic byla i po 6 týdnech expozice TiO_2 eNPs pod limitem detekce.

Transmisní elektronová mikroskopie prokázala agregáty inhalovaných eNPs CdO, PbO, Mn_3O_4 , CuO, ZnO a překvapivě i TiO_2 ve všech studovaných orgánech exponovaných myší. Souhrnné výsledky tak potvrzují předpoklad, že kovy zjištěné v orgánech představují sumu kovů z nerozpuštěných eNPs a ionizované formy kovů.

Provedené inhalační experimenty potvrdily, že inhalace nanočástic primárně vede k postupné akumulaci sledovaných eNPs kovů v plicích jako vstupním orgánu, odkud jsou tyto eNPs a jejich rozpustné formy transportovány krví do dalších orgánů, kde dochází k sekundární akumulaci.

Stopová prvková analýza a atomová spektrometrie

Oddělení stopové prvkové analýzy, Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i., detašované pracoviště Praha, Vídeňská 1083, 142 00 Praha

Lidé odedávna potřebovali z rozličných důvodů zjišťovat obsah prvků, zejména kovů, v různých materiálech. Ať už šlo o to určit, jaký kov obsahuje daný minerál nebo ruda, či zda ten či onen byl opravdu otráven arzenem. Tradičně se analýzy dělaly na mokré cestě a kvalitativní i kvantitativní analýza byla založena na vzniku charakteristického zabarvení či sraženiny. Milovníci českých komedií si jistě vybaví scénku točící se kolem prokázání hliníku ve vzorku z filmu *Marečku, podejte mi pero*. V kvantitativní analýze se používaly jednoduché metody založené na vážení (gravimetrie) a titrování (volumetrie). Ani dnes nevymizely z analytické praxe úplně, a to díky své jednoduchosti a nenáročnosti. Nicméně během 20. století postupně nabývaly na významu instrumentální analytické metody, nejčastěji založené buď na elektrochemických dějích, nebo na interakci vzorku se zářením a na měření odpovídajících spekter.

Atomová absorpční spektrometrie

Rozvoj stopové prvkové analýzy začal v sedmdesátých letech minulého století se zavedením metody atomové absorpční spektrometrie (AAS). Využívá měření absorpce elektromagnetického záření volnými atomy prvků. Aby mohlo dojít k absorpci záření, musí mít záření vhodnou vlnovou délku, resp. energii přesně odpovídající energetickému rozdílu mezi základním a excitovaným stavem atomu. Energie záření je tak specifická pro každý prvek. Zdrojem záření bývají speciální výbojky, které v sobě obsahují stanovovaný prvek. Při zapnutí výbojky v ní dochází k procesům atomizace a následné excitace volných atomů. Při jejich deexcitaci dochází k vyzáření fotonů s energií, jež může být následně absorbována volnými atomy analytu. Množství absorbovaného záření je podle Lambertova–Beerova zákona přímo úměrné koncentraci stanovovaného prvku ve vzorku. Analyt se převádí ze vzorku na formu volných atomů v atomizátoru a vždy je třeba k tomuto procesu dodat energii. Prvními a nejjednoduššími atomizátory byly hořáky s plamenem acetylen-vzduch

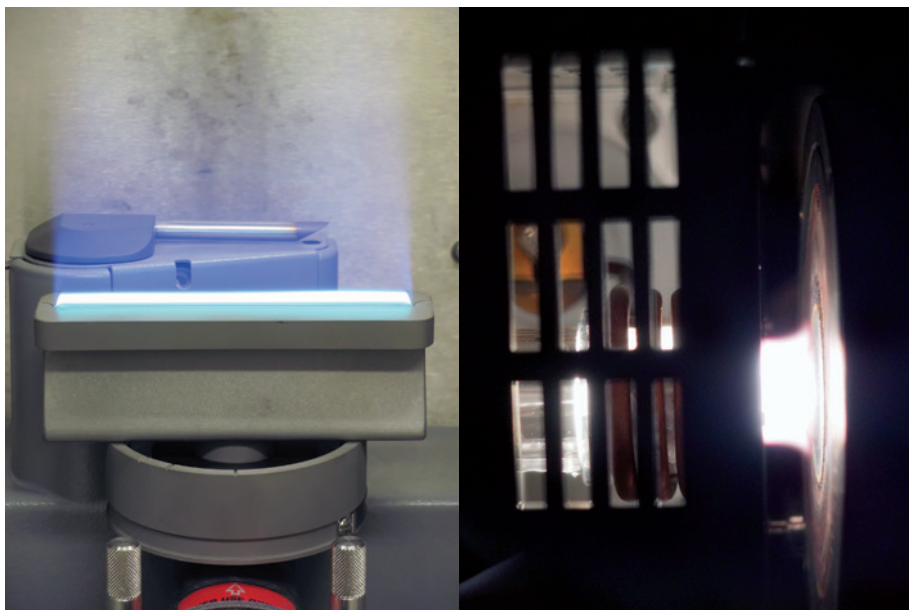
(viz obr. 14), do nichž byl zmlžován kapalný vzorek. Takové uspořádání dovolilo stanovit většinu prvků periodické tabulky na úrovni mg l^{-1} (ppm, *parts per million*). Omezením této metody je zejména nízká účinnost zmlžování (v jednotkách %) a velké zředění analytu plyny v plameni. Pro mnohem citlivější analýzy se postupně začaly používat spektrometry s elektrotermickou atomizací. V tomto uspořádání je atomizátorem grafitová trubička (délka 3 cm, průměr 0,5 cm) vyhřívaná odporově elektrickým proudem. Malý objem kapalného vzorku (10–20 μl) je automaticky dávkován přímo do atomizátoru. Ten je následně zahříván v několika krocích, přičemž postupně dochází k vysušení vzorku (100–150 °C), jeho rozkladu (800–1000 °C) a konečně i atomizaci a detekci analytu (2000 °C). Atomová absorpční spektrometrie s grafitovými atomizátory umožňuje stanovení prvků až tisíckrát citlivěji než plamenová AAS, tj. na úrovni $\mu\text{g l}^{-1}$ (ppb, *parts per billion*). Principiální nevýhodou AAS je, že dovoluje v jednom měření stanovit pouze jeden prvek. Pro stanovení jiného analytu ve stejném vzorku je nutné měnit nastavení přístroje a analýzu opakovat. To prodlužuje čas analýzy a zvyšuje nároky na obsluhu.

Optická a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Proto se už v devadesátých letech začaly prosazovat spektrometry, ve kterých se aerosol vzorku zmlžuje do indukčně vázaného plazmatu (ICP, *inductively coupled plasma*, viz obr. 14). Argonové plazma má teplotu okolo 10 000 °C, obsahuje tedy velké množství energie. Sloučeniny obsahující stanovovaný prvek jsou kompletně rozloženy, vznikají volné atomy v základním i v excitovaných stavech a také nabitě ionty. Excitované atomy a ionty emitují záření na charakteristických vlnových délkách. Vzniká spektrum elektromagnetického záření, které obsahuje kvalitativní i kvantitativní informace o vzorku. Z vlnových délek čar lze vypočítat koncentraci daného prvku. Přestože citlivost optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) je jen o málo lepší než plamenové AAS, jedná se dnes o běžně používanou a robustní metodu se širokým uplatněním v rutinní praxi. Důvodem je hlavně možnost simultánního stanovení všech analytů v rámci jedné analýzy.

Faktu, že v argonovém plazmatu vznikají ionty, využívá spojení ICP s hmotnostní spektrometrií (ICP-MS). Zde ionty vzniklé v plazmatu fyzicky vstupují do hmotnostního spektrometru, kde jsou separovány, a je registrováno hmotnostní spektrum. Plazmová hlavice je prakticky stejná jako u ICP-OES. Svazek nabitých iontů je fokusován iontovou optikou a vstupuje do analyzátoru, kde jsou ionty separovány podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a přímo dopadají na detektor. Analyzátor jsou většinou jednoduché hmotnostní kvadrupóly s rozlišením dostačujícím pro odlišení izotopů lišících se o jednotku. Pro speciální aplikace existují i ICP-MS spektrometry s vysokým rozlišením. Na počátku 21. století se metoda ICP-MS postupně stala hlavním nástrojem stopové prvkové analýzy. Umožňuje stanovit prvky na koncentrační úrovni ng l^{-1} (ppt, *parts per trillion*). Jedná se o nejcitlivější techniku v oblasti stopové prvkové analýzy, která navíc umožňuje simultánní stanovení prvků.

Všechny výše popsané metody analytické atomové spektrometrie jsou metody relativní. Kvantifikace se provádí na základě porovnání signálu vzorku se signály standardů o známé koncentraci.



Obr. 14 Plamenový atomizátor pro AAS (vlevo) a indukčně vázané plazma jako zdroj iontů pro ICP-MS (vpravo)

Příprava vzorku k analýze

Příprava vzorku je nedílnou součástí analýzy a někdy i její Achillovou patou. Většina analytických instrumentálních metod je uzpůsobena pro vnášení kapalných vzorků. Pevné vzorky musí být převedeny do kapalné formy s jednoduchým složením matrice. To se typicky provádí mikrovlnným rozkladem v kyselinách za zvýšené teploty a tlaku (viz obr. 15). Po rozkladu je potřeba vzorky před analýzou mnohonásobně zředit. Během celého procesu je zapotřebí vyvarovat se rizik kontaminace vzorku nebo ztrát analytu. Některé vzorky z odolných materiálů nelze rozložit v mikrovlnných zařízeních a je nutné použít drastičtější postupy, např. alkalické tavení nebo tavení v přítomnosti oxidačního činidla (viz obr. 16). Analytické metody kompatibilní s dávkováním pevného vzorku nebo jeho suspenze existují, mohou být však využity spíše okrajově. Za zmínku stojí metody využívající laserové ablace (LA). Materiál vzorku je laserovým pulsem vypařen a odpařené částice jsou vedeny do ICP-MS, kde jsou atomizovány, následně ionizovány a detegovány (viz výše). Další možností je spektrální analýza plazmatu vznikajícího na povrchu vzorku při laserovém pulzu, pak mluvíme o spektroskopii laserem buzeného plazmatu (LIBS, *laser induced breakdown spectroscopy*). Emise z plazmatu je vyhodnocována analogicky jako v případě ICP-OES (viz výše). Metody s laserovou ablací lze využít i k mapování prvkového zastoupení ve vzorku s rozlišením ve stovkách mikrometrů.

Speciační analýza prvků

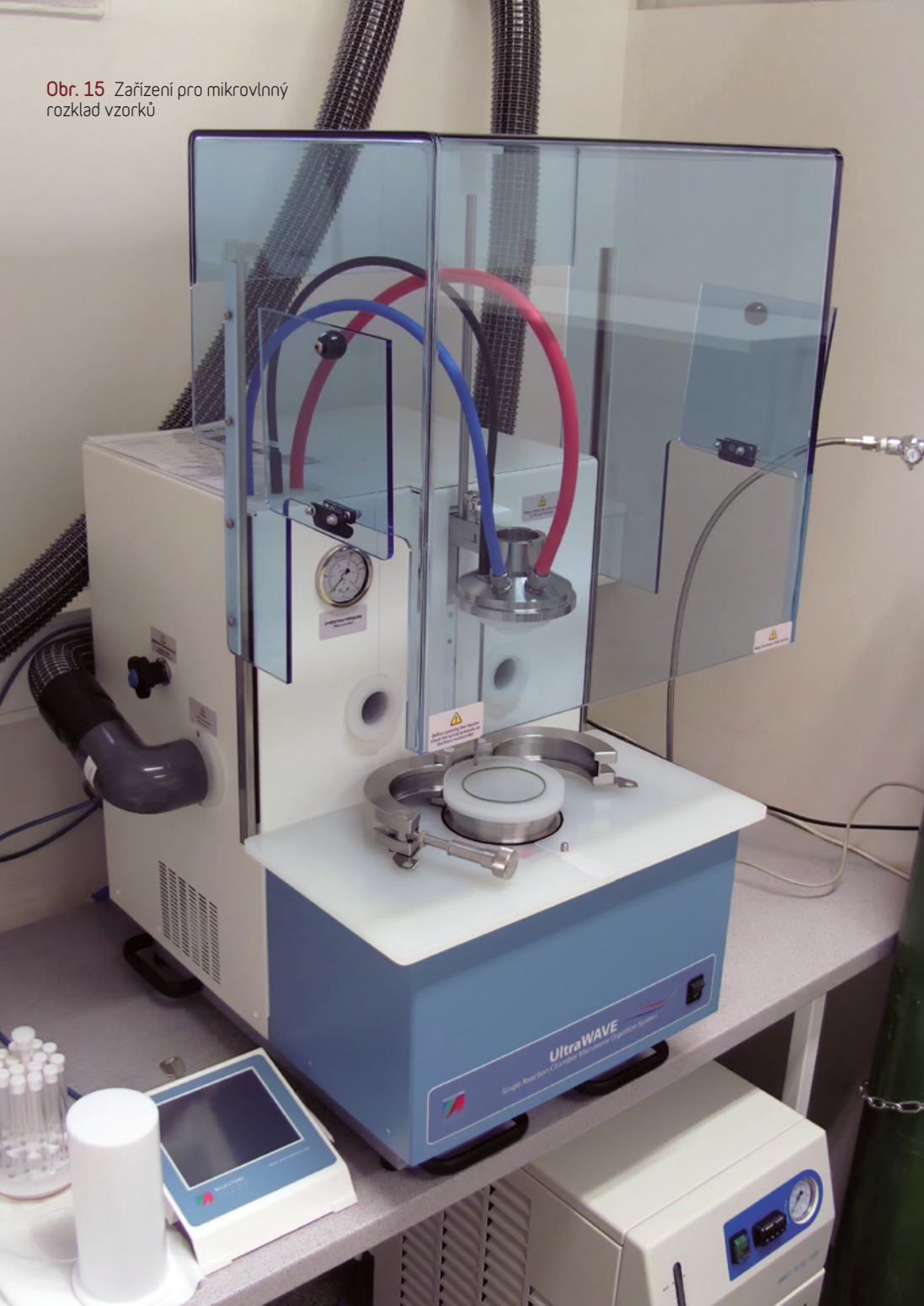
S kompletním rozkladem vzorku je spojena i ztráta informace o formě, ve které se prvek ve vzorku vyskytoval. Přitom různé chemické formy prvků, tzv. *specie*, mohou mít velice různé fyzikálně-chemické vlastnosti, které výrazně ovlivňují jejich toxicitu, biologickou aktivitu, biodostupnost či mobilitu v životním prostředí. Stopová speciační analýza je proto v současnosti jedním z hlavních trendů ve stopové prvkové analýze. Znalost zastoupení jednotlivých specií prvku také dovoluje lépe posuzovat míru škodlivosti daného prvku při jeho výskytu v životním prostředí, či naopak jeho využitelnosti živými organismy. Požadavek na provádění speciační analýzy začíná pomalu pronikat i do legislativy, kdy jsou uváděny limity pro přítomnost konkrétní chemické formy (například anorganického arzenu) namísto celkového obsahu prvku. Metody atomové spektrometrie ze své podstaty, kdy dochází k atomizaci molekul obsahujících analyt, detegují pouze prvek samotný, nikoliv jeho formu (specii). Díky své vysoké citlivosti a selektivitě jsou však atomové spektrometrické metody přesto nejvhodnějšími detektory i pro speciační analýzu. Musí však být splněna jedna zásadní podmínka, a sice aby jednotlivé specie prvku přítomné ve vzorku byly vnášeny do detektoru postupně. Detekční metodě se proto předřazuje separační metoda, například kapalinová či plynová chromatografie, která dokáže rozdělit jednotlivé formy prvku, a ty jsou pak detegovány odděleně. Těto separaci předchází komplikovaná příprava vzorku, zahrnující šetrnou extrakci jednotlivých specií z matrice vzorku. Často je rovněž nutné specie analytu po extrakci zkoncentrovat z většího objemu vzorku. Separace i přípravné procesy už jsou vysoce specifické a šité na míru pro daný problém, typ vzorku a prvek. Uplatnění stopové a speciační analýzy prvků je velmi široké. Následující příklady ilustrují, jak rozmanité jsou problémy, kterými se na oddělení stopové prvkové analýzy Ústavu analytické chemie AV ČR zabýváme.

Stopová prvková a speciační analýza v praktických aplikacích

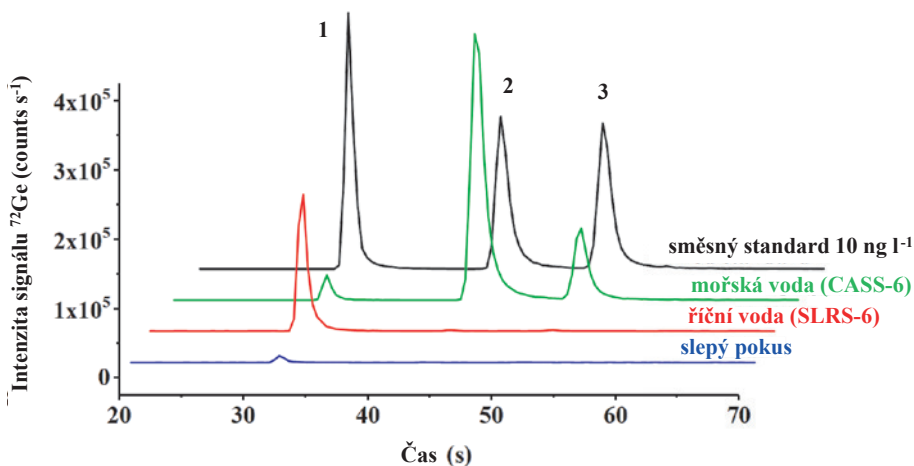
Speciační analýza arzenu v potravinách. Arzen je názorným příkladem prvku, u něhož se toxicita jednotlivých specií výrazně liší. Specie s organicky vázaným arzenem jsou většinou netoxické, zatímco ty obsahující anorganický arzen, tj. arzenitany a arzeničnany, jsou velmi toxické. Potravin y mořského původu jsou nejvýznamnějšími zdroji organicky vázaného arzenu přijímaného z potravy. V případě anorganicky vázaného arzenu je v celosvětovém měřítku jeho hlavním zdrojem pro člověka kontaminovaná pitná voda, což je problém, který výrazně trápí některé oblasti např. v Indii, Bangladéši, ale i v USA či Mexiku. Mezi další významné zdroje arzenu patří také rýže. Nedávno stanovený limit pro anorganicky vázaný arzen v rýži činí $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$. Normu bylo možné zavést až poté, co byly vyvinuty rychlé a spolehlivé analytické metody umožňující kontrolu jejího splnění či překročení. Nami vyvinutá analytická metoda bezpečně odlišuje anorganický arzen od jeho jiných specií bez nutnosti použití časově a finančně náročných postupů a je schopna detegovat toxické specie na koncentrační úrovni $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$.

Speciační analýza arzenu v klinických vzorcích. Vývoj metod stopové speciační analýzy vede k lepšímu pochopení rizika a mechanismu závažných onemocnění spojených s chronickou expozicí arzenu. Příkladem jsou analýzy buněk odloučených z výstelky močového měchýře, které po izolaci z moči pacientů mohou sloužit

Obr. 15 Zařízení pro mikrovlnný rozklad vzorků



Obr. 16 Tavení odolného vzorku s peroxidem sodným – stanovení obsahu platinových kovů v katalyzátoru automobilu



Obr. 17 Speciační analýza germania ve vzorcích říční a mořské vody: (1) anorganická forma Ge; organické formy: (2) methyl- (3) dimethyl germanium

jako indikátor expozice arzenem. Naměřené koncentrace arzenem koreluje s výskytem arzenem indukovaného diabetu. Druhým příkladem je vývoj analytické metody pro ultrastopové stanovení specií arzenu v krvi v souvislosti s mutací genu BRCA1 a výskytem karcinomu prsu.

Stanovení a speciační analýza tzv. technologicky kritických prvků. Jedná se o prvky (např. Ge, Te, Ir, Pd, Pt), poměrně vzácné se vyskytující, ale zároveň zásadně důležité pro použití v moderních technologiích. Jejich výskyt v přírodních

vodách je v řádu nízkých jednotek ng l^{-1} , což klade vysoké nároky na analytické metody použitelné pro jejich stanovení. Důsledkem jsou nedostatečně ustanovené hodnoty přirozeného výskytu, potřebné pro monitorování případného znečištění plynoucího z lidské činnosti. Námi vyvinuté analytické metody založené na generování těkavých hydridů germania a telluru, jejich kryogenní prekoncentraci a separaci a ICP-MS detekci dokáží stanovit nejen celkový obsah, ale i specie germania a telluru s dostatečně nízkými limity detekce pro analýzy v přírodních neznečištěných vodách. U germania to je kolem $0,02 \text{ ng l}^{-1}$ pro anorganicky vázané germanium (germaničitan) a $0,01 \text{ ng l}^{-1}$ pro organické specie germania (viz obr. 17). V případě telluru dokážeme stanovit na stejných koncentračních úrovních Te(IV) a Te(VI) .

Příkladem praktické aplikace námi vyvinutých metod je monitoring výskytu specií germania a arzenu v profilech Ženevského jezera v průběhu jarní sezóny. Germanium, jež má vlastnosti podobné křemíku, je v jezeře přítomné v koncentraci $1,4 \text{ ng l}^{-1}$. V průběhu jarní sezóny je spotřebováváno rozsivkami, které ho zabudovávají do svých křemičitých schránek, a proto koncentrace Ge u hladiny klesají. V pozdějších měsících odumřelé rozsivky klesají ke dnu, schránky se rozpouštějí a koncentrace Ge opět rostou. Arzen, který je přítomný v koncentraci asi $1 \mu\text{g l}^{-1}$, tj. desetkrát nižší než je limit pro pitnou vodu, má komplikovanější chemii. V zimě je přítomen jako anorganický arzeničnan – As(V) , který na jaře mikroorganismy redukuje na arzenitan – As(III) . Zároveň přibývá methylovaných specií arzenu, které jsou produktem jejich detoxikačního metabolismu.

Závěrem

Výše uvedené příklady jsou z oblasti stopové prvkové a speciální analýzy – ty jsou jen úzkým výsekem toho, čím se analytická chemie zabývá. Nicméně můžeme v obecné rovině konstatovat, že na nich lze demonstrovat očekávání i nároky kladené na celou analytickou chemii. Tu lze vnímat jako službu společnosti, jejíž dva hlavní cíle jsou v podstatě vždy stejné. Tím prvním je vývoj analytických metod pro stanovení požadovaných složek (majoritních i minoritních, žádoucích i nežádoucích) v daném vzorku s ohledem na jeho složení, které může být u reálných vzorků velmi komplexní. Druhým cílem je rutinní použití vyvinutých analytických metod a poskytnutí relevantních výsledků. Důležitou rolí analytického chemika je navrhnout z existujících analytických metod tu nejvhodnější. Dále je nutné zvolit pro daný vzorek a metodu správné instrumentální parametry, aby stejné množství analytu ve standardech i v reálných vzorcích dávalo shodnou odezvu. V řadě případů je odezva analytu ve vzorku závislá na ostatních složkách ve vzorku přítomných, tzv. matici. Správnost měření je ověřována analýzami referenčních materiálů s certifikovaným obsahem analytů, tzv. certifikovaných referenčních materiálů. Práce analytického chemika se nesmí omezit jen na prostředí laboratoře, ale měl by mít pod kontrolou celý proces od odběru vzorku a jeho transportu do laboratoře přes jeho skladování a předúpravu až do fáze měření a zpracování dat. Výsledky analýz jsou často využívány i odborníky v dalších vědních oborech, v biologii, toxikologii, medicíně, ochraně životního prostředí či v průmyslových odvětvích. Tito koncoví uživatelé pak výsledky analýz interpretují. Aby byly jejich závěry správné, je třeba vzájemná komunikace mezi vědními obory a součinnost analytického chemika nejlépe hned na začátku celého procesu, ještě před odběrem vzorku.

V současnosti se úsilí všech pěti oddělení (oddělení bioanalytické instrumentace, elektromigračních metod, separací v tekutých fázích, analytické chemie životního prostředí a stopové prvkové analýzy) zaměřuje na využití analytické chemie v nejrůznějších oblastech vědy a techniky včetně medicíny, ochrany životního prostředí a kontroly potravin i na vysoce čisté materiály.

Zabýváme se vývojem teoretických východisek, aplikací a instrumentací separačních a spektroskopických metod analytické chemie. Vlastní technologie umožňují výrobu a charakterizaci mikrofluidik a nanomateriálů. Specifickou částí našeho výzkumu jsou metody využívající elektrické pole, sorpci, proudění tekutin, silové pole, chemickou reakci a jejich kombinace, které jsou hnací silou separací.

Spektroskopická oblast výzkumu zahrnuje hmotnostní spektrometrii, atomovou spektroskopii a vývoj optických spektroskopických technik a jejich použití v separačních metodách. Teoretická východiska jsou důležitým a neoddělitelným vedlejším produktem a poskytují také nové a originální znalosti použitelné v jiných vědních oborech, především v biochemii a ve fyzikální chemii.

Předkládaná brožura přináší krátký přehled vybraných výzkumných směrů na Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i. V pěti článcích postupně každé z pěti vědeckých oddělení ústavu představuje vybrané téma ze své činnosti. Pro další informace navštivte www.iach.cz a www.CE-CE.org.

V EDICI VĚDA KOLEM NÁS PŘIPRAVUJEME:

Filip Smolík: **Jak se děti učí mluvit**

Ondřej Dušek: **Sto let starý beton**

Jan Hasil: **Odhalování minulosti Letenské pláně**

V EDICI DOSUD VYŠLO:

M. Filippi, V. Cílek, J. Ulrych a P. Bosák: **Geologický ústav AV ČR**

Martina Ireinová, Marta Šimečková: **Dialektologické oddělení Ústavu pro jazyk český**

Petr Zacharov: **Tornádo**

Edice Věda kolem nás | Co to je...

Ústav analytické chemie AV ČR | Lukáš Alexa, Filip Duša, Miloš Dvořák, Antonín Hlaváček, Jan Kratzer, Jana Krivánková, Pavel Kubáň, Petr Kubáň, Jana Lavická, Tomáš Matoušek, Pavel Mikuška, Jan Přikryl, Anna Týčová, Zbyněk Večeřa, Julie Weisová

Vydalo Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., Nakladatelství Academia. Grafická úprava dle osnovy Jakuba Krče a sazba Serifa. Odpovědná redaktorka Petra Královcová. Vydání 1., 2023. Ediční číslo 13010. Tisk **SERIFA**[®], s. r. o., Jinonická 80, 158 00 Praha 5.

ISSN 2464-6245

Evidováno MK ČR pod e. č. E 22344

Další svazky získáte na:

www.vedakolemnas.cz | www.academia.cz