



Co byste si přáli najít
pod stromečkem?

*

CE

HPLC

GC*FTIR

UV-VIS*AAS

LC/MS*UHPLC

ICP-MS*GC/MS

MP-AES*ICP-OES

GEN

ChromAtoMol

časopis nejen pro analytické laboratoře

číslo 5

vychází zdarma a nepravidelně

Vydavatel:

HPST, s.r.o.
Písnická 372/20
142 00 Praha 4

Tel.: +420 244 001 231

Fax: +420 244 001 235

E-mail: info@hpst.cz

Web: www.hpst.cz

Redakce:

Ing. Ivo Novotný
produktový specialista
ivo.novotny@hpst.cz
Mob.: +420 724 309 027

Ing. Daniela Tršová, Ph.D.
manažer marketingu
daniela.trsova@hpst.cz
Mob.: +420 602 158 401

Ing. Michaela Vránová
marketingový specialista
michaela.vranova@hpst.cz
Tel.: +420 244 001 232
Mob.: +420 731 157 661

Tak a je zima. Konec roku již klepe na dveře a pro většinu z nás je to nejhektičtější období roku, které je ale zakončené svátků a časem zaslouženého klidu. Letošní rok utekl opět šíleným tempem a my můžeme začít hodnotit, jaký pro nás byl, zda jsme splnili, co jsme chtěli, posunuli se dál, nebo zůstali stát na místě. Ve vědě i v práci s našimi přístroji a nejnovějšími technologiemi je vše možné. Cest je mnoho a najít tu správnou někdy není jednoduché. Ale to je ta krása a ten jedinečný pocit, pokud se nám nakonec vše povede, pokoříme hranice, posuneme limity, vymyslíme něco, co všechny překvapí a přinese všem užitek.

Snaží se o to všichni, ale jen málokomu se to povede. Agilentu se to ale letos skutečně opět povedlo, přinesl, co se od lídra očekává, a představil světu revoluční věc. Něco, co mění zásadně možnosti a práci v oblasti plynové chromatografie. Posouzení ale nechám na Vás, a to po přečtení článku o novém plynovém chromatografu **Agilent Intuvo 9000**. Praktické názory uživatelů a aplikace z České republiky Vám přineseme v dalším čísle našeho časopisu. Další unikátní přístrojovou novinkou je systém **Seahorse XF** určený pro profilování parametrů a funkcí metabolismu živých buněk v reálném čase neinvazivní metodou. Jak systém funguje a co umí, se dočtete v části zaměřené na molekulární a buněčnou biologii doplněnou o nové možnosti v sekvenování a první část výpravy do galaxie bioinformatických software.

Metabolomika je vědecký obor využívající mnoho různých vzájemně se doplňujících analytických technik. Jaké možnosti existují v oblasti chromatografie a hmotnostní spektrometrie se dozvíte v článku *Opravdu kompletní řešení pro metabolomiku a integrovanou biologii*. V LC/MS aplikaci zaměřené na *diagnostiku volných plazmatických metanefrinů* naleznete reálné výsledky dosahované v moderních diagnostických laboratořích SPADIA LAB. Automatizace tak běžné GC/MS analýzy, jakou je *stanovení THC a jeho metabolitů v krevním séru*, je pomocí systému GERSTEL snadná a robustní – zjednodušte a zautomatizujte své analýzy.

Oblast kapalinové chromatografie nijak nezaostává a představuje novou generaci HPLC systému **Agilent 1260 Infinity II**. Opět více možností, větší flexibilita a plná kompatibilita se všemi předchozími generacemi. S radostí také vítáme v České republice naši partnerskou společnost Wasson-ECE, která v jejich novém pražském sídle zavádí nejmodernější technologie a buduje komplexní výrobní a aplikační tým specialistů. Ochutnávku možností jejich jedinečných technologií pro oblast plynové chromatografie a automatizace procesů přinášíme v článcích popisujících *řešení pro komplexní kalibraci GC analýz pomocí reaktoru pro úplnou přeměnu organických sloučenin na metan* nebo *Automatizace panelů pro vzorkování s využitím pro explozivní plyny*.

Molekulární spektroskopie má široké použití. Podívejte se na využití *Florescenčního spektrofotometru Agilent Cary Eclipse při měření Cytosolové exprese Zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a jeho derivátů v kvasinkách* nebo *měření čistoty malých objemů DNA s použitím Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometru vybaveného optickým vláknem s mikrosondou*.

Biologické matrice a ICP-MS instrumentace - to byl vždy těžký souboj. Jak se s nimi popere nejnovější **ICP-MS/MS systém Agilent 8900** naleznete v článku popisujícím *stanovení nanočástic SiO₂ v biologických maticích*, které jsou jednou z moderních výzev této instrumentace.

Rád bych Vám na závěr poděkoval za neuvěřitelný rok 2016, který byl pro nás opět v mnoha oblastech rekordní a Vaše důvěra nás povzbuzuje a ujišťuje v tom, že to, co děláme, má smysl.

Užijte si krásnou zimu, vánoční svátky plné pohody a pořádně oslavte vstup do nového roku, ve kterém se na Vás budeme všichni těšit.



Ivo Novotný
šéfredaktor



Obsah

3	Pořádáme
4	Agilent Technologies a inovace (Daniela Tršová)
6	Funkční metabolická analýza živých buněk technologií Agilent Seahorse Extracellular Flux (XF) (Michaela Pluskalová)
8	Analýza funkčního metabolismu v diagnostice a prognóze onemocnění technologií Agilent Seahorse XF (Michaela Pluskalová)
10	ClearSeq Disease Research Panels – zaměřte se při sekvenování na to opravdu důležité (Iva Šenitková)
13	Galaktická dobrodružství - část první (Anastasiya Zidková)
17	Školení a workshopy v oblasti molekulární genetiky a biologie (Michaela Pluskalová)
20	Opravdu kompletní řešení pro metabolomiku a integrovanou biologii od Agilent Technologies (Ondřej Lacina, Jitka Zrostlíková)
24	Stanovení volných plazmatických metanefrinů pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (Magdalena Rajska, Petra Prochazková, SPADIA LAB, a.s)
28	SPADIA LAB, a.s. - Kdo jsme? (www.spadia.cz)
29	Agilent 1260 Infinity II: nová generace kapalinových chromatografů (Jan Kovář)
32	Automatické stanovení $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinolu (THC) a jeho metabolitů v krevním séru pomocí SPE-GC/MS (Michal Čaplygin)
35	Gerstel - Automatická příprava vzorků pro ty nejnáročnější (www.gerstel.com)
36	Wasson-ECE Reaktor pro úplnou přeměnu organických sloučenin na metan: Příslušenství k FID. Řešení pro komplexní kalibraci (Pavel Hrabánek, Wasson-ECE CZ s.r.o.)
38	Automatizace panelů pro vzorkování s využitím pro explozivní plyny (Pavel Hrabánek, Wasson-ECE CZ s.r.o.)
39	MĚJTE VELKÉ SNY! Myslíte, že již není v GC prostor pro velké inovace? Zkuste se zamyslet znovu... (Ivo Novotný)
41	Cytosolová exprese Zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a jeho derivátů v kvasinkách <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Martina Háková)
43	Měření čistoty malých objemů DNA při 4 °C s použitím Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometru s optickým vláknem s mikrosondou (Martina Háková)
45	Stanovení nanočástic SiO ₂ v biologických matricích s využitím Agilent 8900 ICP-QQQ (Martin Juříček)
52	Servisní služby HPST a Zákon o registru smluv (Růžena Penížková)
54	LABICOM s.r.o. přebírá pro ČR distribuci známých značek chemikálií od společnosti SIGMA-ALDRICH (Labicom s.r.o.)
56	Kontakty
60	Nejnovější aplikační literatura

Pořádáme

Hardwarová školení	Kdy:	Kde:	Podrobnější informace:
LC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	23. - 24. 3. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	28. - 29. 3. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MS (single-quad/QQQ pro GC) školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	30. - 31. 3. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	13. - 14. 6. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MS (single-quad/QQQ pro GC) školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	15. - 16. 6. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
LC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	21. - 22. 6. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
GC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	24. - 25. 10. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
MS (single-quad/QQQ pro GC) školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	25. - 26. 10. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware
LC školení, uživatelské dovednosti a diagnostika	2. - 3. 11. 2017	Praha	http://hpst.cz/sluzby/hardware



Softwarová školení:	Kdy:	Kde:	Podrobnější informace:
MassHunter pro GC/MS	3. - 7. 4. 2017	Dříteč	http://hpst.cz/sluzby/software
OpenLAB CDS 2.X	4. - 7. 4. 2017	Dříteč	http://hpst.cz/sluzby/software
OpenLAB ChemStation	4. - 7. 4. 2017	Dříteč	http://hpst.cz/sluzby/software
MassHunter pro GC/MS	16. - 20. 10. 2017	Dříteč	http://hpst.cz/sluzby/software
OpenLAB CDS 2.X	17. - 20. 10. 2017	Dříteč	http://hpst.cz/sluzby/software



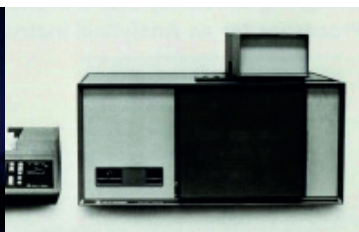


**1938
Nový začátek**
Bill Hewlett a Dave Packard začínají v garáži s 538 dolary v kapse. Jejich prvním produktem se stává audio oscilátor.

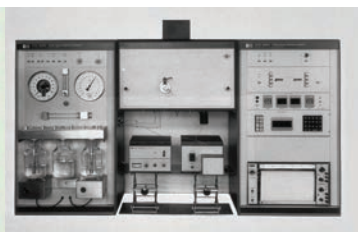
V roce 1987 byla jejich garáž zaregistrována mezi kalifornské historické památky.



Věděli jste, že...
Audio oscilátor značky Hewlett-Packard byl použit pro testování technického vybavení během natáčení filmu Walta Disneye „Fantasia“ v roce 1939?



**1973
5830 GC**
Vyrábí se prvním mikroprocesorem řízený plynový chromatograf.
Robert Metcalfe objevuje jednoduchý způsob vzájemného propojení počítačů. Pojmenovává ho „Ethernet“.



**1973
HP 1010 HPLC**
První HPLC instrument s nálepkou Hewlett-Packard vážil více než půl tuny. Kolony byly plněny nejmodernějšími částicemi o velikosti 57 μm.



**1976
HP 5992A**
První stolní GC/MS instrument je uveden na trh.

Sonda Viking 1 úspěšně přistává na Marsu a zůstává v provozu 6 let.



**1979
Křemenné kapiláry**
Tato technologie zjednodušuje GC analýzu a umožňuje identifikaci většího množství látek.

Virus neštovic se stal první lidskou nemocí, kterou se podařilo vymýtit.



**1985
LC/MS interface**
HP vyvíjí LC/MS thermospray interface pro 5988A LC/MS, což umožňuje využití rozpouštědel pro analýzu na reverzní fázi.

Byl vytvořen DNS (Internet's Domain Name System).



**1994
HP 4500 ICP-MS**
První stolní ICP-MS na světě umožňuje rutinní analýzu stopových prvků.

Andrew Wiles ověřuje platnost Velké Fermatovy věty, „nejslabšího matematického problému“.



Věděli jste, že...
Agilent uvedl na trh nejjasnější LED diodu na světě v roce 1994. Díky své intenzitě, spolehlivosti a nízké spotřebě energie nahradila lampy se žhaveným vláknem v mnoha aplikacích.



**1995
1100 Series HPLC**
Modulární design a snadná obsluha: Agilent uvádí na trh nejpopulárnější HPLC systém.

Vzniklo DVD – optické diskové počítačové paměťové médium.



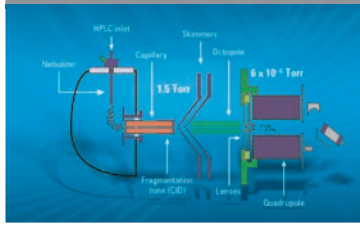
**1995
6890 GC**
První GC, který umí uzamknout retenční časy a automatický backflush zabráňující kontaminaci GC systému maticí ze vzorku.

Byla založena Světová obchodní organizace (WTO).



**1997
1100 Series LC/MSD**
Agilent uvádí na trh svůj první stolní LC/MS systém.

Ovce Dolly se stává prvním úspěšně klonovaným savcem.



**1997
Ortogonalní ESI zdroj**
Tento LC/MS zdroj nastavuje nový standard pro čistotu a kontrolu interferencí.

V Japonsku je předvedena Toyota Prius, první sériově vyráběný hybridní automobil.

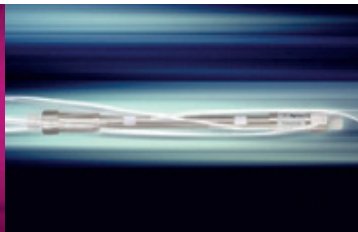


**2001
Poroshell 300**
Průkopnická technologie povrchově porézních částic je použita do prvních komerčně dostupných LC kolon. Je publikován první koncept projektu Lidský genom.



**2003
Agilent LC/MS TOF**
Se svojí inovativní letovou trubicí z niklové oceli je jedním z prvních LC/MS instrumentů s měřením přesné hmoty.

Apple uvádí na trh aplikaci iTunes Store.



**2003
Zorbax RRHT**
První sub-2 μm kolony umožňující kombinovat rychlost a velké rozlišení. První předvedení fluorescenční lampy se studenou katodou (CCFLs).



Věděli jste, že...

Agilent zanechal stopu ve filmech Neuvěřitelný Hulk, Transformers a Spiderman. Ve filmu Avengers je na pracovním stole Tonyho Starka vidět několik měřících přístrojů Agilent (dnes Keysight Technologies).



2005 HPLC-Chip/MS

První mikrofluidní LC/MS čip pro proteomiku.

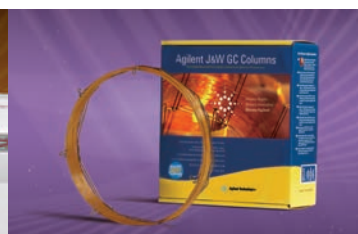
HP představuje novou nanotechnologii, která může nahradit tradiční tranzistory v počítačových čipech.



2005 Multimode Ion Source

První iontový zdroj na světě, který umí simultánně generovat ionty ESI i APCI.

Ve Francii byla provedena první transplantace lidské tváře.



2008 Agilent J&W Ultralert

Nikdy před tím nevykazovaly GC kolony tak vysokou inertnost a tak nízký bleeding.

CERN spustil Velký hadronový urychlovač (LHC).



2011 Inert OneNeb Nebulizer

Metody ICP-OES a MP-AES jsou nyní citlivější a robustnější.

Proběhla první transplantace umělého orgánu za použití umělé průdušnice pokryté kmenovými buňkami.



2011 4100 MP-AES

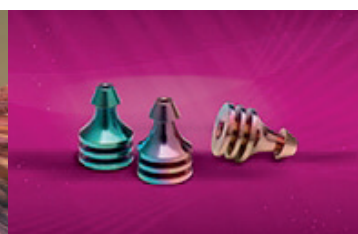
Tento průlomový nástroj pro elementární analýzu běží pouze na vzduch.

Celosvětová populace dosáhla hranice sedmi miliard (12 let po dosažení hranice 6 miliard).



Věděli jste, že...

V roce 2011 míří Agilent J&W UltiMetal GC kolony na Mars na palubě NASA roveru Curiosity při hledání důkazů o životě na Marsu.



2013 UltiMetal GC Ferrules

Analytici už se nemusejí obávat leaků, poškození kolony nebo fitinků.

Peter Higgs a Francois Englert získávají Nobelovu cenu za objev Higgsova bosonu („božské částice“).



2013 PLOT PT GC kolony

Kolony s integrovanou ochranou proti částicím na obou koncích ušetří mnoho problémů.

Elon Musk představuje koncept vysokorychlostního transportního systému „Hyperloop“.



2014 A-Line Quick Connect

Fitinky, se kterými každý snadno provede dokonalé napojení LC kolony.

Sonda Voyager 1, kterou NASA vypustila v roce 1977, vstupuje do mezihvězdného prostoru.



2014 1290 Infinity II LC

Unikátní technologie Dual-Needle pro rychlejší nástřikové cykly.

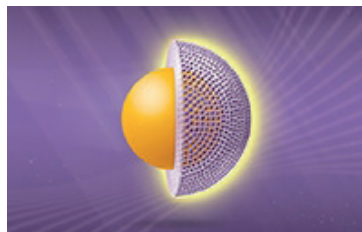
Vzniká první komerční skener mozku, který nahřává myšlenky a vzpomínky a umožňuje jejich přehrávání.



2014 4300 Handheld FTIR

Lehký a ergonomický nástroj pro ne-destruktivní analýzu kdekoli a kdykoli.

Indická vesmírná sonda Mangalyaan doletěla na oběžnou dráhu Marsu.



2014 Poroshell HPH

První kolony s povrchově porézními sub-3 μm částicemi pro měření při vysokém pH.

Paraplegik Juliano Pinto provedl první výkop při Světovém poháru v Sao Paulu s použitím robotického obleku.



2015 EMR-Lipid QuEChERS

Tento originální sorbent selektivně odstraňuje lipidy z potravinářských vzorků.

Obecná teorie relativity Alberta Einsteina slaví 100 let.



2015 Self Tightening Column Nut

Už žádné volné spoje! Tato univerzální matice spolu s grafito-polyimidovými ferulemi zaručuje těsné napojení GC kolony.

Na Marsu byly objeveny stopy vody.



2016 Intuvo 9000 GC

První plynový chromatograf na světě se spojí na principu čipové technologie. Bez ferulí, bez netěsností!

Němečtí vědci poprvé stabilizovali vodíkové plazma, což je klíčový krok pro uskutečnění jaderné fúze.

Funkční metabolická analýza živých buněk technologií Agilent Seahorse Extracellular Flux (XF)

6

Mitochondriální funkce a glykolýza hrají klíčovou roli v různých buněčných procesech, kam se řadí aktivace buněk, proliferace, diferenciace, buněčná smrt či progresse onemocnění. Energetický metabolismus představuje významný indikátor funkce buněk. Současné výzkumné studie ukazují na větší propojení mezi oxidativní fosforylací a glykolýzou, než se dříve předpokládalo. Jako příklad může posloužit změna v energetických drahách pluripotentních kmenových buněk v raném stádiu diferenciace (Zhou 2012). Změna metabolismu na převážně glykolytický metabolismus je jedním z raných indikátorů maligního versus benigního bujení. Obecně se dá říci, že pozměněný buněčný metabolismus může být citlivějším indikátorem stresu, stárnutí, progresse nemoci či účinku léčiv než tradiční „end-point“ markery. Identifikace faktorů a mechanismů zodpovědných za změny mitochondriálního energetického metabolismu, které mají za následek změnu metabolického fenotypu, představují v současnosti aktivní výzkumnou oblast buněčné patofyziologie onemocnění.

Princip měření Seahorse XF

Seahorse Extracellular Flux (XF) je patentovanou technologií, která umožňuje profilování parametrů a funkcí metabolismu živých buněk v reálném čase neinvazivní metodou, jež nevyžaduje přidavek dalších látek. Analyzátoři Seahorse měří paralelně mitochondriální respiraci a glykolýzu.

Mitochondriální respiraci zaznamenává Seahorse XF prostřednictvím rychlosti spotřeby kyslíku v dýchacím řetězci (OCR). Glykolýza se měří prostřednictvím rychlosti extracelulárního okyselování (ECAR). K měření dochází pomocí optických senzorů, které však nejsou v přímém kontaktu se vzorkem buněk. Nemůže tudíž dojít ke vzájemné kontaminaci vzorků ani není nutné čištění senzorů. Měření rovněž není ovlivněno přítomností dalších látek nebo intracelulární fluorescencí. Jako monochromatický zdroj excitace jsou použity LED diody, které pracují při tak nízkých excitačních energetických hladinách, že není ovlivněna intenzita signálu v průběhu experimentu.

Seahorse Extracellular Flux Analyzery mají integrované čtyři injekční porty, které umožňují postupný přidavek až čtyř látek (např.

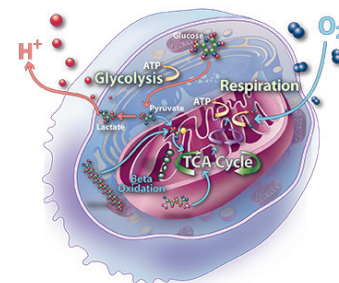
substrátu, inhibitoru či léčiva) ke stejnému vzorku. Dávkování je možné libovolně časově naprogramovat pro automatickou aplikaci ke všem sledovaným vzorkům zároveň. Vlastní kinetické měření probíhá v dočasně vytvořené mikrokomůrce. Tento mikroprostor se vytvoří jen po krátkou dobu kinetického měření, po té se buněčná suspence promíchá.

Pro sledování parametrů metabolismu v živých buňkách je možné použít libovolná činidla nebo léčiva. Lze také využít některý z osvědčených kitů, médií nebo dalších reagensů od Seahorse XF. Tyto metody se staly zlatými standardy pro kvantifikaci mitochondriální respirace, glykolytické aktivity, endogenní a exogenní oxidace mastných kyselin, oxidace substrátu nebo metabolickou fenotypizaci. Předností použití Seahorse kitů a protokolů je automatický výpočet metabolických parametrů pomocí softwaru Seahorse XR Report Generatoru.

Buněčný materiál

Aplikace technologie Seahorse Extracellular Flux (XF) směřuje do různých výzkumných oblastí jako například výzkum rakoviny, obezity, cukrovky, metabolických onemocnění, imunologie, kardiovaskulární funkce, neurodegenerativních onemocnění, toxikologie, virologie a stárnutí. Technologie Seahorse XF může být použita k měření energetického výdeje, využití substrátu, pro popis mitochondriální funkčnosti a celkové buněčné homeostázy.

Technologie Seahorse XF byla použita pro nejrozličnější aplikace na buněčných liniích, primárních buňkách, izolovaných svalových vláknech, izolovaných mitochondriích, Langerhansových ostrůvkách, 3D sféroidech,



Obrázek 1

AT Seahorse XF Analyzátoři měří zároveň dvě hlavní energetické dráhy v buňkách – mitochondriální respiraci (OCR) a glykolýzu (ECAR) – v živých buňkách v reálném čase.

Buňky tvoří ATP pomocí glykolýzy nezávisle na kyslíku a zároveň produkují laktát a protony. Seahorse XF měří glykolýzu stanovením rychlosti okyselování extracelulární oblasti – ECAR.

Mitochondrie spotřebovávají kyslík během oxidace mastných kyselin a jiných substrátů pro tvorbu ATP. XF Seahorse měří mitochondriální respiraci měřením rychlosti spotřeby kyslíku buněk – OCR.



Obrázek 2

Funkční metabolická data pro komplexní pohled na buněčné procesy a patologii technologií Agilent Seahorse XF, která zahrnuje jak hardware, software, spotřební materiál, tak i zavedené kity pro detailní analýzu klíčových parametrů mitochondriální nebo glykolytické funkce, metabolické fenotypizace buněk nebo substrátové preference.

či jiných než savčích modelových organizmech, mezi které patří *C. elegans*, *D. melanogaster*, kvasinky nebo embrya *Dania pruhovaného*. Měření je možné jak pro suspenzní, tak adherentní buňky, přičemž adherentní buňky není nutné uvolňovat do suspenze pomocí trypsinu.

Díky tomu, že technologie Seahorse XF je neinvazivní metoda bez vnášení dalších barevných značek, tak se buňky po skončení experimentu mohou dále použít pro další aplikace, izolace či dlouhodobé experimenty. Pro měření jednoho vzorku je potřeba obvykle 5×10^3 až 5×10^5 buněk v jedné jamce nebo 3-6 μl suspenze izolovaných mitochondrií (2,5-5 μg). Pro měření mitochondriální respirace není nutné mitochondrie izolovat a lze měřit funkci mitochondrií v celých buňkách a sledovat tak mitochondrie ve fyziologicky relevantním prostředí buňky.

Zpracování a analýza naměřených dat probíhá prostřednictvím softwarového programu Wave od Seahorse, odkud mohou být snadno exportována do Excelu nebo do programu Seahorse XF Report Generators pro další grafickou analýzu dat.

Seznam publikací, ve kterých se používá technologie SeahorseXF, je dostupný použitím odkazu na stránce:

<http://hpst.cz/molekularni-biologie/bunecna-analyza-seahorse-xf/seahorse-bioscience->

-je-nove-soucasti-agilent-technologies.

Michaela Pluskalová

michaela.pluskalova@hpst.cz

Literatura:

ZHOU, W., M. CHOI, D. MARGINEANTU, et al. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J.* 2012, 2012(31(9), 2103-16.

Výzkumná oblast

- Obesita, diabetes & metabolické poruchy
- In vitro toxicita
- Imunologie
- Neurodegenerativní onemocnění
- Stárnutí
- Onkologická onemocnění
- Výzkum nových léčiv

Klíčová slova

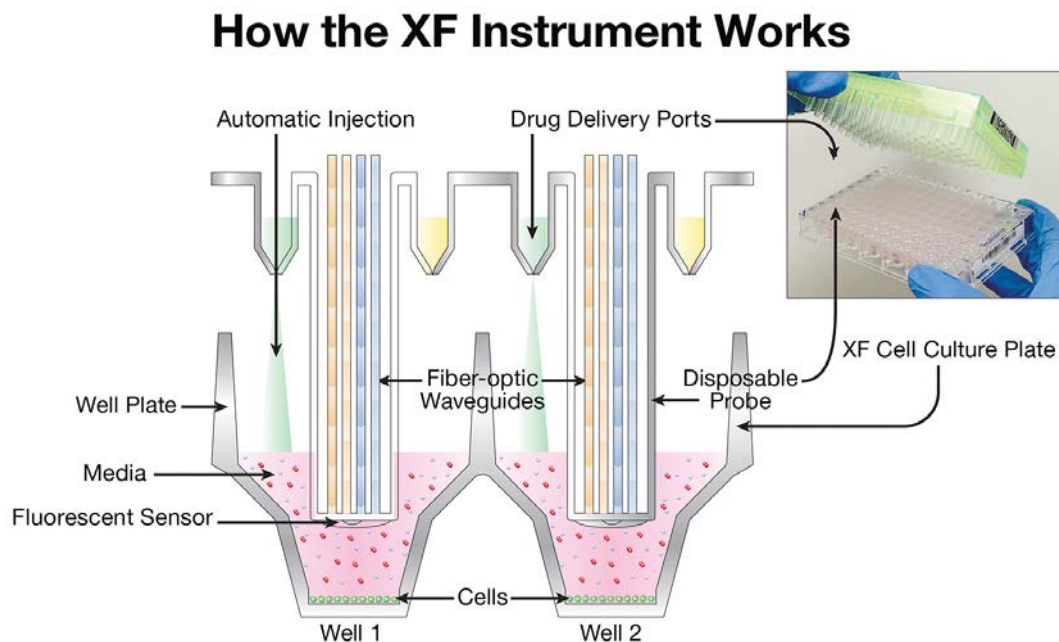
- mitochondriální respirace
- energetický metabolismus
- glykolýza

Buněčný materiál

- Izolovaná svalová vlákna
- Buněčné linie
- Primární buňky
- Mitochondrie
- Langerhansovy ostrůvky
- 3D sféroidy
- *C. elegans*, *D. melanogaster*
- kvasinky
- rybí embrya *Dania pruhovaného*

Termíny

- XF – extracellular flux
- OCR – rychlost spotřeby kyslíku (oxygen consumption rate)
- ECAR – rychlost okyselení extracelulárního prostoru (extracellular acidification rate)



Obrázek 3

Seahorse XF Analyzátoři využívají pro měření patentovanou technologii sensorových kazet s fluorescenčními senzory, které mají mikrodestičkový formát a umožňují měření neznačených živých buněk. Pro vlastní měření se vytváří přechodně mikrokomůrka, což umožňuje přesné, citlivé a šetrné stanovení změn koncentrací kyslíku i protonů v extracelulárním médiu současně. Integrované injekční porty postupně dávkuje až 4 činidla pro detailní studium buněčného metabolismu, odpovědi buněk na různé dávky inhibitorů, aktivátorů, léčiv atp. XF kulturační mikrodestičky jsou vhodné pro většinu buněk a je možné použít i speciální destičky pro větší vzorky jako jsou sféroidy, Langerhansovy ostrůvky, rybí embrya atp.

Analýza funkčního metabolismu v diagnostice a prognóze onemocnění technologií Agilent Seahorse XF

Určení funkčního metabolismu krevních buněk v souvislosti s diagnostikou a prognostikou onemocnění

Současné studie dávají do souvislosti mitochondriální dysfunkci s patologickými stavy jako nádorová onemocnění, diabetes a kardiovaskulární onemocnění. Překážkou pro další výzkum v této oblasti je nedostatek relevantních buněčných modelů. Získání vzorků od pacientů představuje obvykle vyšší invazivní zásah a navíc tyto vzorky nebývají dostatečným indikátorem mitochondriální dysfunkce. Z mnoha směrů vítaným řešením by mohlo být použití krevních buněk nebo destiček jako výhodné alternativy ke vzorkům z tkání jakožto dostupného zdroje mitochondrií.

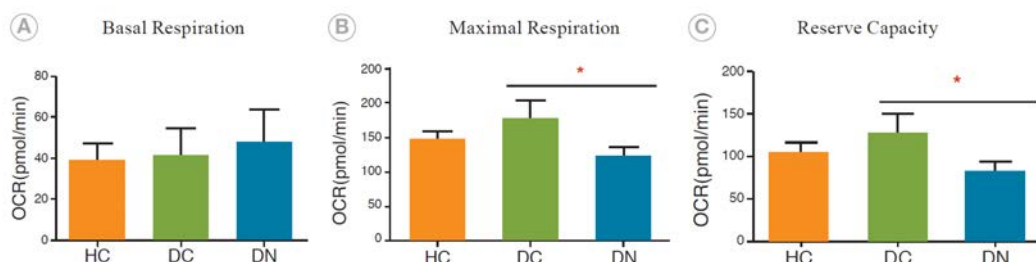
Periferní krevní mononukleární buňky (PBMC) jsou heterogenní buněčnou populací, kterou tvoří různé typy buněk včetně monocytů, T-buněk a NK buněk. Předpokládalo se, že tato buněčná populace odráží systémové změny v těle a mohla by z tohoto důvodu být zdrojem citlivých biomarkerů (Chacko et al.; Maynard et al. 2013). Tyto buňky se začaly stále více používat při diagnostice a monitorování onemocnění. Technologie Seahorse Extracellular Flux Analyzátorů je v kombinaci s dostupnými kity, médii a dalšími reagensy širokým nástrojem pro získání relevantních funkčních metabolických dat v různorodých terapeutických oblastech. Metabolická analýza přístroji Seahorse XF umožňuje v reálném čase simultánní měření rychlosti spotřeby kyslíku (OCR) a rychlosti okyselování extracelulárního prostředí (ECAR) v dočasně vytvořené mikrokomůrce ve speciálních mikrodestičkách. Technologie Seahorse XF byla např. použita pro výzkum profilu

mitochondriální respirace v periferních mononukleárních buňkách získaných od pacientů s cílem nalézt vhodnou metodiku, která by mohla posloužit jako prediktivní biomarker. Dále v textu jsou uvedeny příklady současných publikací autorů, ve kterých využili technologii Seahorse XF pro měření funkčního metabolismu krevních buněk a destiček získaných od pacientů a zdravých dárců.

Metabolické profilování pacientů s diabetem v souvislosti s rizikem renálního selhání

Czajka et al. (2015) ve své srovnávací studii použili periferní mononukleární buňky pro porovnání pacientů s diabetickou nefropatií (DN), diabetické pacienty bez onemocnění ledvin (DC) a jako kontroly zdravé dárce (HC). Diabetická nefropatie představuje nejčastější příčinu renálního selhání a počet těchto případů u diabetických pacientů stále vzrůstá.

Autoři vycházeli z hypotézy, že měření OCR (rychlost spotřeby kyslíku) a ECAR (rychlost okyselení extracelulárního prostředí) by mohlo sloužit jako indikátor metabolického stresu souvisejícího s diabetem. S použitím technologie Seahorse XF stanovili metabolické profily periferních mononukleárních buněk všech tří zmíněných testovaných skupin, DN, DC a HC. Jak je vidět na Obrázku 1, metabolické parametry každé testované skupiny vykazovaly výrazné rozdíly. Zatímco základní rychlost respirace se jevila u všech testovaných skupin podobná (Obrázek 1A), hodnota obou dalších sledovaných parametrů – maximální respirace a rezervní kapacita (Obrázek 1B a 1C) byla významně snížena u pacientů s diabetickou nefropatií.



Obrázek 1

Analýza mitochondriální respirace v periferních monocytárních buňkách (PBMC).

PBMC byly izolovány z krve pacientů s diabetickou nefropatií (DN), pacientů s diabetem (DC) a zdravých dárců (HC). K vzorkům buněk byl postupně přidán oligomycin, FCCP a kombinace antinomycinu A a rotenonu. Byla vyčíslena základní respirace (A), maximální respirace (B) a rezervní kapacita (C).

Literatura

CZAJKA et al., Altered mitochondrial function, mitochondrial DNA, and reduced metabolic flexibility in patients with diabetic nephropathy. *EBioMedicine*. 2015, 2(6), 499-512.

CHACKO et al., The Bioenergetic Health Index: A new concept in mitochondrial translational research. *Clin Sci (Lond)* 2014, 127, 367-373.

KRAMER PA et al., A review of the mitochondrial and glycolytic metabolism in human platelets and leukocytes; Implications for their use as bioenergetic biomarkers. *Redox Bol*. 2014, 2, 206-10.

MAYNARD et al., Relationships between human vitality and mitochondrial respiratory parameters, reactive oxygen species production and dNTP levels in peripheral blood mononuclear cells. *Aging*. 2013, 5(11), 850-64.

TYRELL DJ et al., Blood-cell bioenergetics are associated with physical function and inflammation in overweight/obese older adults. *Exp Gerontol*. 2015, 70, 84-91.

XU W et al., Platelets from asthmatic individuals show less reliance on glycolysis. *PLoS One*. 2015. 10(7), e0132007.

Tyto výsledky ukazují, že za normálních podmínek je základní mitochondriální respirace ve všech sledovaných případech stejná. Avšak při stresových podmínkách dochází u buněk pacientů s diabetickou nefropatií k redukci aktivity mitochondrií. Autoři použili ve studii čerstvě izolované lidské PBMC a analyzovali je na přístroji Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer s použitím kitu Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Výsledky studie ukazují různé rozdíly funkčního metabolismu periferních mononukleárních buněk izolovaných od pacientů s diabetem bez onemocnění ledvin, pacientů s diabetickou nefropatií a zdravých dárců. Dále předpokládají, že snížení mitochondriálního metabolismu může vést k progresi diabetické nefropatie. Tato studie upozorňuje na použití PBMC jako vhodného modelu metabolické dysfunkce u pacientů s diabetickou nefropatií, a mohl by se dále vyvinout jako indikátor translace mitochondriální dysfunkce.

Bioenergetika krevních buněk v souvislosti s obezitou a procesem stárnutí

Proces stárnutí představuje univerzální a komplexní fenomén, který je charakterizován progresivními změnami různých fyziologických funkcí. Zatímco hodnocení tělesného stavu jedinců či testovaných skupin zahrnuje různé fyziologické systémy, jako např. svalový kosterní systém, tyto testy se nezabývají biologickými mechanismy, které jsou s procesem stárnutí spojeny a také nevypovídají o funkčních aspektech specifických tkání. Ve studii Tyrrella et al (2015) autoři použili periferní mononukleární buňky (PBMC) získané od dárců seniorů, dárců se sedavým způsobem života a dárců s nadváhou nebo obezitou s cílem určit vztah mezi metabolickými vlastnostmi PBMC a tělesnou funkcí.

Autoři použili pro sledování periferních monocytárních buněk kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test a pro vlastní měření použili Seahorse XF24-3 Extracellular Flux Analyzer. Popsali zvýšenou maximální respiraci a rezervní (spare) dýchací kapacitu v PBMC

u dárců s vyšší kvalitou svaloviny na nohách, silou stisku a nižšími hodnotami IL-6, což je cytokin známý svým významem při chronickém zánětu. Tyto výsledky ukazují na korelaci mezi metabolickými profily PBMC a markery stárnutí včetně svalové hmoty i její kvality a celkové tělesné funkce. Jak autoři poznamenávají, měření PBMC může sloužit jako diagnostický a prognostický nástroj, který je možné pohotově použít v klinických zkouškách i gerontologii.

Metabolická aktivita destiček u pacientů s astmatem

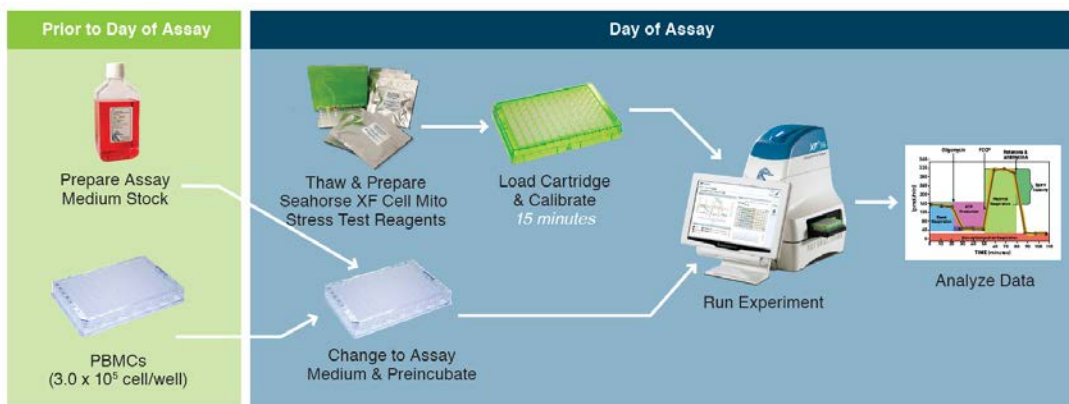
Výběr vhodného buněčného modelu je kritickým momentem ve všech výzkumných oblastech, které studují metabolické změny, aby se mohla navrhnout efektivní terapeutická a léčebná strategie specifická pro konkrétní onemocnění. Ukázalo se například, že změněný buněčný metabolismus hraje důležitou úlohu u astmatu, chronického zánětlivého onemocnění dýchacích cest. Možnost použití lidských destiček pro screening pacientů s astmatem zjišťovali Xu se svým kolektivem (2015).

Autoři použili Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer pro měření destiček izolovaných ze vzorků žilní krve. Zjistili, že destičky pacientů s astmatem mají spíše oxidativní vlastnosti, a tudíž se u nich projevuje nižší závislost na glykolýze v porovnání se zdravými dárci. Tento metabolický posun (shift) od glykolýzy k mitochondriální respiraci u astmatických pacientů umožňuje nový pohled na metabolickou charakterizaci astmatu, a navíc upozorňuje na možnost použití krevních buněk jako biomarkeru pro monitorování závažnosti onemocnění.

Další příklady aplikací Agilent Seahorse naleznete přes naše webové stránky: <http://hpst.cz/molekularni-biologie/bunecna-analyza-seahorse-xf>.

Michaela Pluskalová

michaela.pluskalova@hpst.cz



Obrázek 2

Schéma analýzy s kity a přístroji Seahorse Extracellular Flux Analyzer

ClearSeq Disease Research Panels

– zaměřte se při sekvenování na to opravdu důležité

Nově navržené panely genů Vám nyní umožňují zaměřit Vaši pozornost pouze na cílové oblasti, které jsou prokazatelně spojené s onemocněním nebo skupinou onemocnění, které jsou ve středu Vašeho zájmu. Zatímco běžné metody jako cytogenetické vyšetření, hybridizace fluorescenčních sond in situ (FISH) a amplifikace jednotlivých genů byly dříve metodami první volby při studiu nádorových vzorků nebo při zkoumání vrozených onemocnění, dnes je již vyžadováno bližší a hlubší pochopení molekulární podstaty většiny onemocnění za účelem kompletnější genetické charakterizace. Při Vaší práci Vám mohou usnadnit čas i peníze produkty zahrnuté do dvou velkých skupin: „ClearSeq Cancer Research Panels“ a „Constitutional Disease Research Panels“.

ClearSeq Cancer Research Panels

Katalogové designy jsou cíleně zaměřené na vybrané skupiny genů tak, aby Vám umožnily srovnání detekovaných somatických variací solidních nádorů i nádorových onemocnění krve. Všechny panely byly navrženy ve spolupráci s předními experty na danou problematiku a umožňují s jistotou určit mutace, indely i fúzní geny ve vzorcích FFPE, krve a kostní dřeni.

Všechny panely využívají technologie HaloPlex nebo SureSelect a práce s nimi Vám poskytne rychlé výsledky i pro vzorky limitující kvality nebo množství. Data získaná sekvenováním můžete následně snadno a v krátké době analyzovat pomocí bezplatného softwaru SureCall.

ClearSeq Comprehensive Cancer

Tento panel je zaměřen na 151 genů spojených s nádorovými onemocněními, jako je například rakovina prsu, plic, kolorekta a akutní myeloidní leukémie (Tabulka 1). Design byl navržen tak, aby umožnil hluboké pokrytí všech zahrnutých oblastí a tím zabezpečil bezpečnou a důvěryhodnou detekci variant.

Kompatibilní se systémem SureSelect Target Enrichment.

ClearSeq AML

Panel zahrnuje 20 genů, které jsou často mutovány u akutní myeloidní leukémie (Tabulka 2).

Design je navíc navržen tak, aby plně pokrýval všechny cílené oblasti více amplicony a zajistil tak bezpečný záchyt somatických variant.

Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlexTarget Enrichment.

ClearSeq Cancer

Panel zaměřený na 47 genů, které jsou podle COSMIC katalogu označeny jako „hotspots – rizikové oblasti“ spojované s mnoha typy rakoviny nebo s oblastmi, které jsou cílem účinku léků (Tabulka 3). COSMIC databáze byla hlavní referencí pro vývoj tohoto panelu. Navíc díky tomu, že využívá technologie HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment, je velmi vhodným pro práci se vzorky z formalinových bločků. Jeho technologie, kdy je každá báze pokryta více amplicony, umožňuje vysoké sekvenční pokrytí i u velmi degradovaných vzorků.

ClearSeq Human DNA Kinome

Tento panel je určen pro všechny, kteří se ve svých studiích zaměřují na studium exprese genů kódujících kinázy, prokázané biomarkery, které jsou spojovány s mnoha typy onemocnění včetně rakoviny. Design pokrývá více než 500 známých kináz a několik genů spojených s nejrozšířenějšími typy rakoviny. Celkově tento design o velikosti 3,2 Mb zahrnuje 612 genů a s nimi spojených UTR oblastí. Kompatibilní se SureSelect Target Enrichment.

ClearSeq Human RNA Kinome

Panel zahrnující skupinu kináz a s kinázami spojených transkriptů, ve kterém je zahrnuto celkem 500 kináz a 612 genů.

I tento panel je kompatibilní se systémem SureSelect Target Enrichment.

ABL1	BRCA1	EGFR	JAK2	MYC	PIK3CA	RUNX1
AKT1	BRCA2	ESR1	KRAS	MYD88	PTCH1	SMO
ALK	CDKN2A	FGFR2	KIT	NF1	PTEN	STK11
APC	CEBPA	FLT3	MAP2K2	NOTCH1	PTPN11	TET2
ASXL1	CTNNB1	HRAS	MET	NPM1	NRAS	TP53
ATM	DNMT3A	IDH1	KMT2A	MTOR	RB1	VHL
BRAF	ERBB2	IDH2	MPL	PDGFRA	RET	WT1
ABCB1	CYP19A1	FBXW7	IL2RB	MLH1	ROS1	SMARCB1
ABCC2	CYP2A6	FGFR1	IL2RG	MST1R	RPS6KB1	SNCAIP
ABL2	CYP2B6	FGFR3	INPP4B	NELL2	RXRA	SOS1
AKT2	CYP2C19	FGFR4	JAK1	PDGFRB	RXRB	SPRED1
AKT3	CYP2C9	FLT1	JAK3	PHF6	RXRG	SRC
ATRX	CYP2D6	FLT4	KDM6A	PIK3R1	SHH	SUFU
CBL	DDR1	FSTL5	KDR	PSMB1	SHOC2	TAS2R38
CDA	DDR2	GNA11	LAMA2	PSMB2	SLC22A1	TRRAP
CDH1	DDX3X	GNAQ	LCK	PSMB5	SLC22A2	TYK2
CDKN2B	DPYD	GNAS	LTK	PSMD1	SLC31A1	UGT1A1
CHD7	ERBB3	GSTP1	MAP2K1	PSMD2	SLC34A2	YES1
CHIC2	ERBB4	H3F3A	MAP2K4	RAF1	SLC45A3	ZMYM3
CREBBP	ERG	HNF1A	MAP3K1	RARA	SLCO1B1	
CRLF2	ESR2	IKZF1	MAPK1	RARB	SMAD4	
CSF1R	EZH2	IL2RA	MED13	RARG	SMARCA4	

Tabulka 1
ClearSeq Comprehensive Cancer

ASXL1	12	EZH2	8, 17, 18	MPL	10	SF3B1	13–15, 17
CSF3R	14, 17	FLT3	14, 20	NPM1	11	SRSF2	1
CBL	8, 9	IDH1	4	NRAS	2, 3	TET2	3, 9, 10, 11
CEBPA	1	IDH2	4	RUNX1	3, 4, 8	TP53	5–8
DNMT3A	4, 8, 13, 15, 16, 18 19, 20, 22, 23	JAK2	12, 14	SETBP1	3	U2AF1	2, 6

Tabulka 2
ClearSeq AML

ABL1	EGFR	FGFR3	KRAS	PIK3R1	VHL	CSF1R	FGFR1
JAK3	PDGFRA	STK11	BRAF	FANCF	MAP2K2	NPM1	SMO
AR	FANCA	IDH1	MET	RUNX1	AKT1	ERBB2	FLT3
MAP2K1	PTEN	WT1	CTNNB1	FGFR2	KIT	PIK3CA	TP53
CDKN2A	FANCG	JAK2	NRAS	SRC	ATM	FANCC	IDH2
NOTCH1	SMAD4	ALK	ERBB4	HRAS	MAP2K4	RET	

Tabulka 3
ClearSeq Cancer

TTR	MYH6	ACTC1	CSRP3	DES	ABCC9	RBM20	DSC2
MYL2	MYH7	TNNI3	PLN	LMNA	SCN5A	TGFB3	TMEM43
MYL3	MYBPC3	TPM1	TNNC1	SGCD	TAZ	DSP	JUP
MYOZ2	TNNT2	TTN	TCAP	VCL		PKP2	
NEXN		ACTN2		LDB3		DSG2	

Tabulka 4
ClearSeq Cardiomyopathy

KCNQ1	ANK2	CACNA1C	AKAP9	GPD1L	SCN1B	RYR2	
KCNH2	KCNE1	CAV3	SNTA1	CACNB2	KCNE3	CASQ2	
KCNJ2	KCNE2	SCN4B	SCN5A		SCN3B		

Tabulka 5
ClearSeq Arrhythmia

Constitutional Disease Research Panels

Panely zahrnuté v této skupině jsou navrženy tak, aby Vám umožnily komplexní analýzu genů způsobujících nejčtenější genetická onemocnění.

ClearSeq Inherited Disease

Tento rozsáhlý panel byl navržen ve spolupráci s vědci z „Medical Genetics, Charite Berlin“ tak, aby umožnil přesnou analýzu 2 742 genů, u kterých je prokázáno spojení s vrozenými onemocněními. Spojení tohoto panelu s technologií SureSelect umožňuje hluboké sekvenační pokrytí všech oblastí a zároveň výrazně zrychluje Vaši práci díky zkrácenému času hybridizace. Katalogový panel je navíc možné rozšířit také o oblasti Vašeho zájmu a celou analýzu tedy připravit přímo na míru požadavkům Vašeho pracoviště.

ClearSeq Cardiomyopathy

Design tohoto panelu je navržen pro účel studia vrozených forem kardiomyopatie. Na základě dostupných revuálních publikací na téma kardiomyopatie a informací získaných z GeneReviews a NIH online dostupných zdrojů byl navržen panel obsahující 34 genů. Tyto geny jsou spojovány s hypertrofickou a dilatační kardiomyopatií a s arytmogenní dysplasií pravé komory (Tabulka 4).

Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

ClearSeq Arrhythmia

Panel zaměřený na oblasti spojované se čtyřmi typy vrozené arytmie obsahuje 20 genů, které jsou ve vztahu se syndromem dlouhého úseku QT, krátkého úseku QT, Brugada syndromem a katecholaminergní polymorfní komorovou tachykardií (Tabulka 5). Geny asociované s různými typy arytmií se často překrývají a tento panel umožňuje vytvoření komplexního profilu ve studovaných vzorcích.

Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

ClearSeq Noonan Syndrome

Panel 13 genů umožňuje studium mutací v oblastech spojovaných s Noonan syndromem a podobných onemocnění, jako je LEOPARD,

cfc syndrom nebo Costello syndrom (Tabulka 6). Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

ClearSeq Connective Tissue Disorders

Tento panel se zaměřuje na analýzu oblastí spojených s vrozenými poruchami pojivové tkáně, mezi které patří např. Marfan syndrom, Ehlers-Danlos syndrom, Loeys-Dietz syndrom, aneuryzma hrudní aorty, Stickler syndrom, ostogenesis imperfecta a další (Tabulka 7).

Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

ClearSeq ICCG

Panel obsahující 180 genů vychází z poznatků a doporučení ICCG, International Collaboration for Clinical Genomics, dříve známé jako ISCA, International Standards for Cytogenomic Arrays.

Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

ClearSeq X-chromosome

Mnoho variant genetických onemocnění je v úzkém vztahu se změnami na X chromosomu. Tento panel umožňuje komplexní studium změn na X chromosomu, které je rychlé, nenáročné na vybavení a spolu s hodnotícím nástrojem SureCall vhodné i pro klinický výzkum. Kompatibilní s HaloPlexHS a HaloPlex Target Enrichment.

Závěr

Během Vaší práce s vybranými panely jsou Vám k dispozici naši aplikační specialisté pro oblast NGS a bioinformatiky, kteří Vás ochotně na Vašem pracovišti zaškolí nejen v přípravě sekvenačních knihoven, ale i v práci se získanými daty. Navíc pokud Vám z jakéhokoli důvodu katalogový panel nevyhovuje, rádi Vám pomůžeme s návrhem vlastního panelu přesně dle Vašich přání a potřeb. Technologie, kterou Agilent Technologies používá pro přípravu „target enrichment“ kitů, umožňuje vyjít naplno vstříc vašim požadavkům a představám bez nutnosti kompromisů.

Iva Šenitková

iva.senitkova@hpst.cz

BRAF	HRAS	SPRED1	NRAS	KRAS	SHOC2	NF1	
CBL	MAP2K1	MAP2K2	PTPN11	RAF1	SOS1		
AMPD1	POMGNT1	CAV3	DES	FHL1	POMT2	FKTN	MYOT
LMNA	ANO5	CHKB	DYSF	ITGA7	SGCA	POMT1	SGCD
SEPN1	PYGM	LARGE	COL6A3	ISPD	TCAP	TRIM32	SIL1
TPM3	TNNI2	COL6A1	EMD	SGCE	SGCB	FKRP	PLEC
ACTA1	CAPN3	COL6A2	DMD	LAMA2	TPM2	TNNT1	SGCG

Tabulka 6
ClearSeq Noonan Syndrome

Tabulka 7
ClearSeq Connective Tissue Disorders

Galaktická dobrodružství

část první

Začínáme sérii návodů o tom, jak pomocí Galaxy zvládnout bioinformatické úlohy.

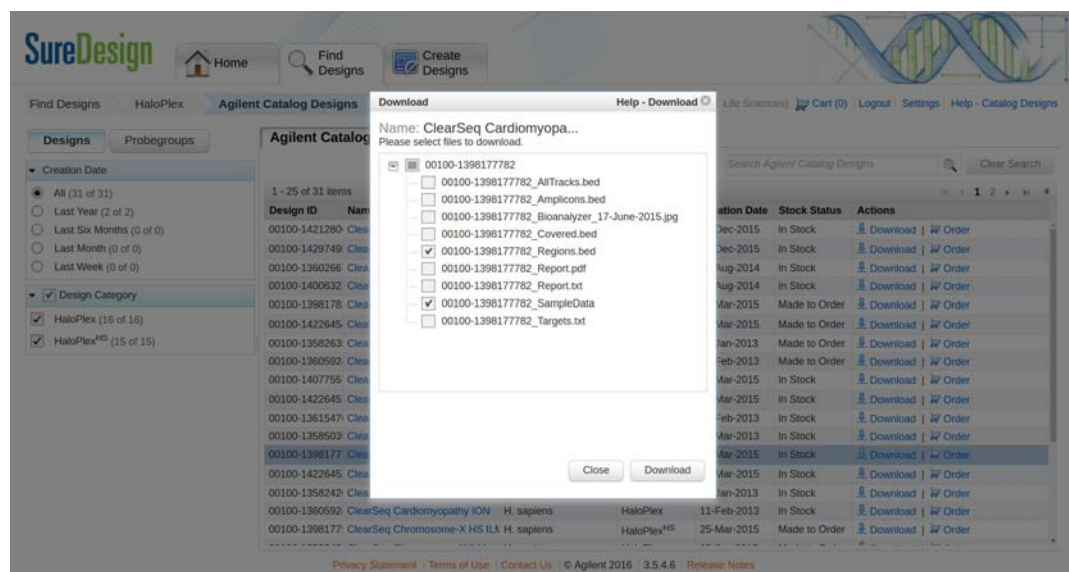
Galaxy je otevřená platforma, dovolující používat velkou škálu (nejen) bioinformatických nástrojů bez použití příkazového řádku. Jako příklad dostupných nástrojů lze uvést samtools, bedtools, annovar, vcftools, bowtie, tophat a jiné. Galaxy není placena, lze ji používat po registraci na <https://usegalaxy.org/> anebo stáhnout na váš server.

První díl je věnován určení hloubky pokrytí jednotlivých genů u DNA NGS dat. Provádíte analýzu pomocí target-enrichment kitů a chcete zjistit, jaká je hloubka pokrytí genů z vašeho designu. V Galaxy vytvoříme postup, který bude obsahovat pouze 4 kroky a dovolí nám podívat se na nejvíce a nejméně pokryté geny. Jako vzorová data použijeme ClearSeq Cardiomyopathy Haloplex HS ILM.

Postup

1. Stáhněte BED soubory obsahující geny zájmu

Pokud ještě nemáte BED soubor, obsahující oblasti, které jsou zahrnuté ve vašem designu, můžete ho stáhnout na stránkách SureDesign (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>). Ze záložky Find design vyberte Haloplex a u příslušného designu vyberte možnost Download. Objeví se vám nabídka souborů, zaškrtněte <id-designu>_Regions.bed, pokud chcete stáhnout také vzorová data, zaškrtněte <id-designu>_SampleData (Obrázek 1).



2. Nahrajte data do Galaxy

Pro tento návod použijte Galaxy na <https://usegalaxy.org/>. Zaregistrujte se a přihlaste se do Galaxy. Měli byste vidět stránku, která je rozdělena do tří částí. Vlevo je panel obsahující nástroje, uprostřed je část, kde se dají prohlížet výsledky a vpravo je historie provedených kroků (Obrázek 2). Pro nahrání dat vyberte Get data -> Upload File.

Poté vyberte možnost Choose local file, u souborů specifikujte typ (BAM nebo BED) a genom (hg19) (Obrázek 3).

Galaxy is an open source, web-based platform for data intensive biomedical research. If you are new to Galaxy start [here](#) or consult our help resources. You can install your own Galaxy by following the [tutorial](#) and choose from thousands of tools from the [Tool Shed](#).

Try Galaxy on the Cloud

Now you can have a personal Galaxy within the infinite Universe

Tweets by @galaxyproject

Michael Schatz @mschatz
By popular demand, we have extended the abstract deadline by 2 weeks for the @CSHL_Biological Data Science meeting: [meetings.cshl.edu/meetings.aspx?...](#)

Galaxy Australia @GalaxyAustralia
Initiated through @EMBL_ABR, we aim to join Australian Galaxy users through communication, training and events: [embi-abr.org.au/galaxyaustrali...](#)

Logos: PENNSTATE, JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, TACC, CYVERSE

The Galaxy Team is a part of the Center for Comparative Genomics and Bioinformatics at Penn State and the Department of Biology and at Johns Hopkins University.

This instance of Galaxy is utilizing infrastructure generously provided by the CyVerse at the Texas Advanced Computing Center, with support from the National Science Foundation.

The Galaxy Project is supported in part by NSF, NHGRI, The Huck Institutes of the Life Sciences, The Institute for CyberScience at Penn State, and Johns Hopkins University.

This is a free, public, internet accessible resource. Data transfer and data storage are not encrypted. If there are restrictions on the way your research data can be stored and used, please consult your local institutional review board or the project PI before uploading it to any public site, including this Galaxy server. If you have protected data, large data storage requirements, or other challenges you are encouraged to setup your own Galaxy instance or run Galaxy on the Cloud.

Galaxy version 18.07-e1, commit 4121179179b3298958f424624711244b4c1

Download from web or upload from disk

Regular Composite

Name	Size	Type	Genome	Settings	Status
00100_139617792_Regions.bed	28.2 KB	bed	Human Feb. 2009 (GRCh37)	100%	✓
00100_139617792.bam	18 MB	bam	Human Feb. 2009 (GRCh37)	100%	✓

Type (set all): Auto-detect Local FTP

Genome (set all): Human Feb. 2009 (GRCh37) hg19

3. Spočítejte pokrytí jednotlivých oblastí
Pro tuto úlohu využijte nástroj od samtools - BedCov, který vypočítá hloubku pokrytí pro námi specifikované úseky. Tento nástroj najdete před NGS:SAMtools -> BedCov calculate

read depth for a set of genomic intervals. Vyberte příslušný název BED a BAM souboru a spusťte analýzu (Obrázek 4). Měla by se objevit zpráva o úspěšném odeslání požadavku na zpracování (Obrázek 5).

BedCov calculate read depth for a set of genomic intervals (Galaxy version 2.0)

BED file
1. 00100_139617792_Regions.bed

BAM file
2. 00100_139617792.bam

What it does
Calculates read depth for regions listed in a BED dataset using `cat $(ls bedcov) | samtools bedcov [INPUT BED] [INPUT BAM] ... [INPUT BAM] - [OUTPUT]`

Citations

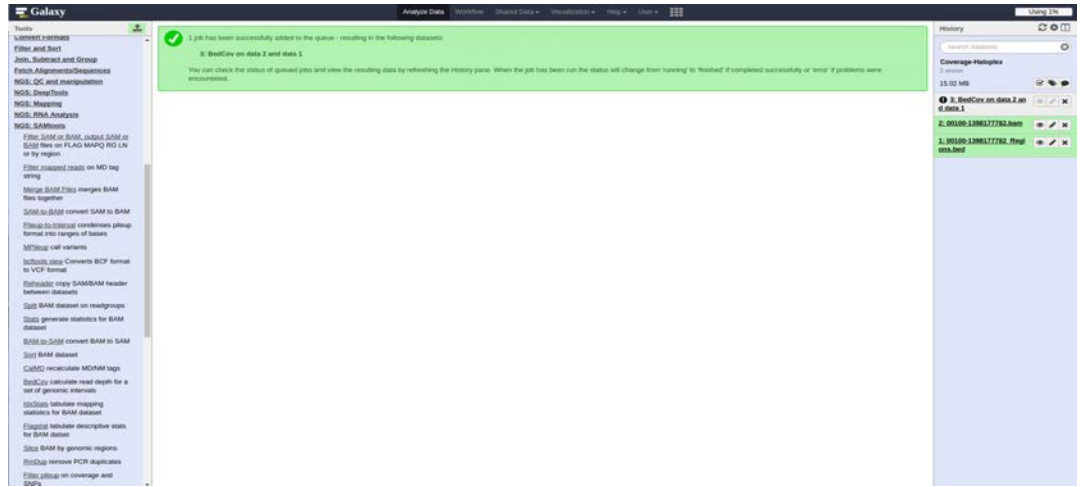
Definition of SAMBAM format. [1,2]
 Li, H. and Handsaker, B. and Wysoker, A. and Fennel, T. and Ruan, J. and Ai, H. and Peinado, G. and Duvvuri, R. and Liberman, D. and Adikhani, N. and Hyslop, D. and Bonaldi, A. and DiGiuseppe, J. and Daneshmandi, S. and Brakke, M. and Green, P. and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. In *Bioinformatics*, 25 (16), pp. 2078-2079. [doi:10.1093/bioinformatics/btp352](#)

Li, H. (2011). Improving SNP discovery by base alignment quality. In *Bioinformatics*, 27 (8), pp. 1157-1158. [doi:10.1093/bioinformatics/btr080](#)

Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. In *Bioinformatics*, 27 (21), pp. 2987-2993. [doi:10.1093/bioinformatics/btr350](#)

Dawicki, P., Schifano, S., Durbin, R., Multilicic, M. (2012). Multi-allelic calling model in bcftools. In *arXiv preprint arXiv:1205.3463*

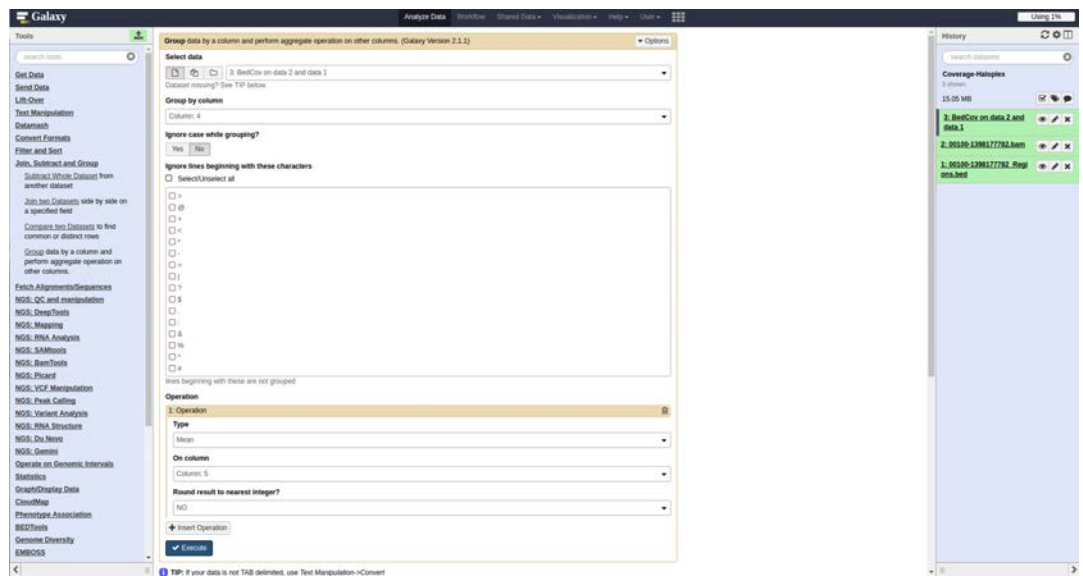
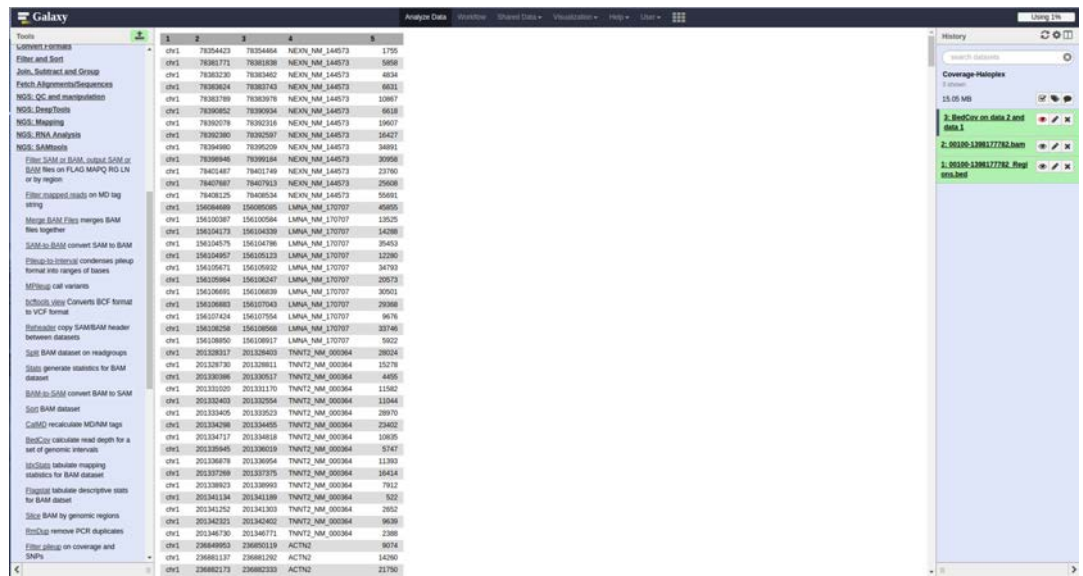
Durbin, R. Segregation based metrics for variant call QC. [3]
 Li, H. Mathematical Notes on SAMtools Algorithms. [4]
 SAMtools GitHub page. [5]



4. Vypočítejte průměrné pokrytí pro každý gen

Výsledkem předešlého kroku byl výpočet pokrytí oblastí specifikovaných v BED souboru. Jak lze vidět, hloubka pokrytí je spočítána pro každý úsek genu zvlášť (Obrázek 6). Data lze prohlédnout pomocí ikonky oka. Potřebujete tedy vypočítat průměrné pokrytí genů.

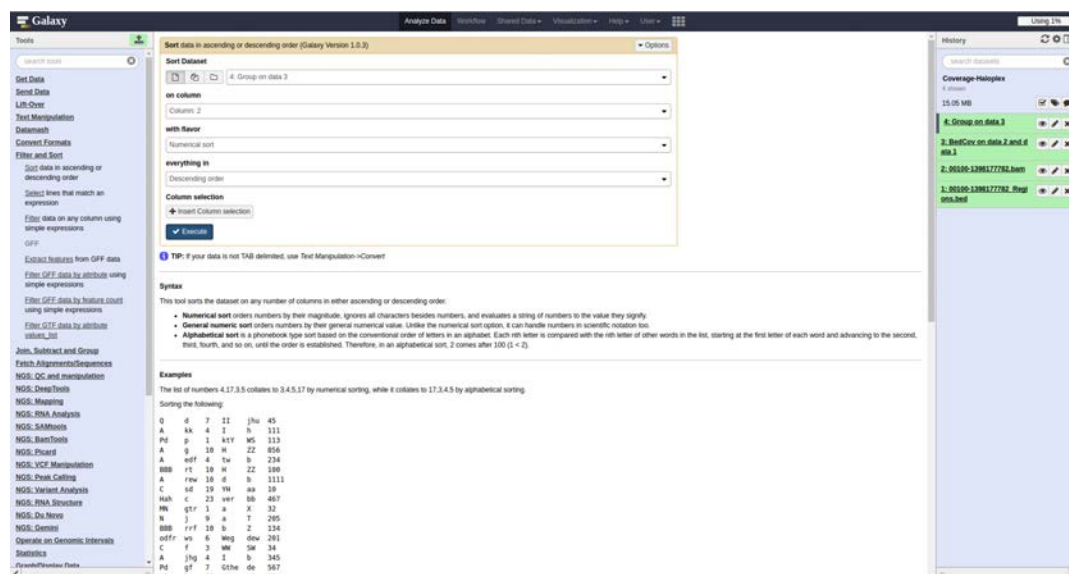
K tomu využijte Join, Subtract and Group -> Group data by a column and perform aggregate operation on other columns s následujícím nastavením (viz Obrázek 7). Seskupte řádky dle sloupce s názvem genů (Group by column: Column 4) a spočtete průměr pokrytí (Operation Type: Mean, On column: Column 5).



5. Seřadte geny od nejvíce po nejméně pokryté

V posledním kroku seřadíte geny od nejvíce po nejméně pokryté. Zvolte pro to Filter and

Sort -> Sort data in ascending or descending order. Seřazovat budete sestupně dle sloupce s hloubkou pokrytí (Obrázek 8). Výsledkem jsou seřazené geny dle pokrytí (Obrázek 9).



Pokud vás zaujala Galaxy a chcete se ji více naučit, objednejte si u nás workshop.

Anastasiya Zidková
azidkova@hpst.cz

Školení a workshopy v oblasti molekulární genetiky a biologie

V roce 2016 jsme pro vás rozšířili nabídku workshopů a školení v oblasti molekulární a nově i buněčné biologie. Novinkou v naší nabídce je možnost využití služeb našeho bioinformatika zaměřených zejména na zpracování dat z NGS. V říjnu jsme do pětice zopakovali praktický workshop na přípravu, zpracování a analýzu CGH microarray. Další novinkou v naší nabídce jsou analyzátoři Seahorse Extracellular Flux pro měření metabolických parametrů v živých buňkách, které jsme představili na praktickém semináři v říjnu 2016.

V roce 2017 budeme pokračovat a rozšiřovat možnosti bioinformatických kurzů. Rádi bychom v druhé polovině roku také nabídli workshopy na přípravu NGS knihoven. Začátkem léta 2017 ve spolupráci s Biocevem budeme pořádat vícedenní workshop, jehož součástí bude také buněčná analýza Seahorse XF. Konkrétní termíny kurzů průběžně aktualizujeme na našich webových stránkách v sekci Služby.

Pokud si chcete být jistí, že Vám neunikne žádná z našich akcí, napište nám na dgg@hpst.cz, abychom si Vás zařadili do seznamu zájemců o workshopy.

Bioinformatické kurzy analýzy dat z NGS

V posledních letech dochází k velkému rozšíření metod, které se označují jako metoda cíleného obohacení nebo sekvenování nové generace („next generation sequencing“, NGS). Tyto metody mají ve srovnání s klasickými sekvenačními metodami řadu výhod, které spočívají především v rychlé a cenově příznivé produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. Metody NGS pracují na principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně. Výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat, což s sebou přináší značná úskalí. Na našich bioinforma-

tických kurzech chceme pomoci si v těchto datech lépe orientovat a naučit se je správně zpracovávat.

Jednou z možností pro ty, kteří používají NGS produkty SureSelect nebo Haloplex od Agilent Technologies, je použít volně přístupný program SureCall od stejného výrobce. Na zpracování dat z NGS pomocí programu SureCall je zaměřen první z nabízených kurzů: „SureCall a jiné nástroje pro analýzu dat z metody cíleného obohacení.“

Jednodenní kurz začíná seznámením s technologií NGS z bioinformatického hlediska. Na školení se můžete naučit, jak se vyznat ve formátech, které se v NGS používají (FASTQ, FASTA, BAM, SAM, BED, VCF) a jak lze zkontrolovat kvalitu dat pomocí FASTQC. Dále se podrobně prochází procesem zpracování vzorků v SureCall se zaměřením na porozumění parametrům analýzy. Další část je věnována tomu, jak anotovat data (ClinVar, OMIM, UniProt) a co znamenají hodnoty predikce významu mutace (SIFT, PolyPhen). Prakticky se pro tyto účely předvede webový nástroj pro anotaci a prohlížení dat (variant effect predictor). Velká část školení se věnuje analýze a konzultaci výsledků dat uživatelů. Všechny použité materiály účastníkům kurzu poskytujeme v elektronické podobě.

Školení pořádáme v sídle naší firmy v Praze. Je však také možné se domluvit na školení přímo na vašem pracovišti. Délka školení je přibližně 7 hodin.

Pokud potřebuje zpracovat svá data z NGS ještě jinak, např. potřebujete analýzu zopakovat pro nové vzorky nebo s jinými parametry, než vám nabízí přednastavený software, je pro vás určené další bioinformatické školení: „**Bioinformatická analýza s Galaxy bez znalosti příkazové řádky**“.

Proč analyzovat data jinak? Přednastavené softwary mají většinou příznivé grafické rozhraní, ale postrádají flexibilitu a jsou do jisté míry i typickými „blackboxy“.



Obrázek 1
SureCall pro zpracování NGS dat

Ohlasy předchozích účastníků

„Školení mi zaplnilo plno „černých“ míst, obzvláště ve zpracování surových NGS dat.“

-- Mgr. Diana N. Grochová, Ph.D., Cytogenetická laboratoř Brno

„Děkuji za velmi cenné informace, krásně srozumitelně a přitom velmi kvalifikovaně podané.“

-- Mgr. Josef Včelák, Endokrinologický ústav, Oddělení molekulární endokrinologie

Galaxy je webová platforma, dovolující práci s nástroji pro příkazovou řádku (bowtie, samtools, SnpEff, VarScan, gemini), aniž byste museli umět používat příkazovou řádku.

Galaxy také dovoluje nejrůznější práci s textovými soubory (seřazování, pokročilé vyhledávání, spojení dat, agregace atd.). Pro to, abyste mohli začít používat Galaxy, stačí registrace zdarma anebo instalace Galaxy na váš server.

Dvoudenní kurz o Galaxy má za cíl pomoci účastníkům lépe se zorientovat mezi velkým množstvím nástrojů a začít efektivněji samostatně analyzovat data z NGS. Postupně se seznámí s jednotlivými nástroji a s tím, jak lze vytvářet workflow, sdílet svojí analýzu a vytvářet reporty. Je možné si vyzkoušet analyzovat i vlastní DNA a RNA data pod dohledem zkušeného bioinformatika.

Školení je opět možné si domluvit individuálně přímo na vašem pracovišti pro vaši pracovní skupinu. Informace o plánovaných školeních aktualizujeme průběžně na našich internetových stránkách: <http://hpst.cz/sluzby/workshopy>.

Praktický workshop zaměřený na analýzu CGH microarray

Metoda komparativní genomické hybridizace na bázi microarray (aCGH) může být použita pro různé aplikace, mezi které patří zejména cytogenetika nebo onkologie. Možnost detekovat a kvantifikovat mikrodelece a mikroamplifikace je klíčová pro pochopení biologické podstaty v těchto výzkumných oblastech. Agilent používá pro aCGH metodu dvojího fluorescenčního značení a to experimentálního

vzorku současně s relevantní referencí pro měření změn počtu kopií DNA (CNC), ztráty heterozygocity nezávislé na počtu kopií nebo uniparentální disomii.

Cílem „**Praktického workshopu zaměřeného na analýzu CGH microarray**“ je seznámit se teoreticky i prakticky s technologií aCGH pod vedením zkušeného aplikačního specialisty RNDr. Zbyňka Halbhubera, Ph.D. Můžete si vyzkoušet celý protokol se svými vzorky genomické DNA (výběr designu, fluorescenční značení, hybridizace, promytí microarray, sken a vyhodnocení). Pro skenování microarray používáme přístroj **Agilent SureScan Microarray Scanner**. Praktickou část workshopu paralelně prolínají teoretické přednášky s možností aktivní diskuse. Tento workshop se dočkal již pěti opakování. Workshop znovu uspořádáme při zájmu alespoň čtyř účastníků.

Služba skenování CGH microarray

Pokud se rozhodnete obohatit svou vědeckou práci o metodiku aCGH, avšak nejste přístrojově vybaveni, můžete využít služeb naší laboratoře v sídle HPST, s.r.o. v Praze. Po domluvě si můžete v laboratoři CGH microarray připravit, naskenovat i vyhodnotit. V případě zájmu o bližší spolupráci nám napište na dgg@hpst.cz.

Měření buněčného metabolismu technologií Seahorse XF

Důležitost buněčného metabolismu v oblastech výzkumu diagnostiky, prognostiky i léčby nádorových onemocnění, studia procesu stárnutí, neurodegenerativních, metabolických a kardiovaskulárních chorob stimuloval



Obrázek 2
Otevřená webová platforma vhodná například pro analýzu dat z NGS



Obrázek 2
Momentky z microarray workshopů
(Autor fotografií: Michaela Plusková)



Obrázek 3

Agilent Seahorse XF - technologie pro měření metabolismu v živých buňkách

vývoj dalších přístupů ke studiu mitochondriální funkce a disfunkce. Agilent Seahorse Extracellular Flux nabízí patentovanou technologii unikátního simultánního měření rychlosti spotřeby kyslíku (OCR), které odráží mitochondriální funkci, a zároveň rychlosti okyselování extracelulární oblasti (ECAR), jež je mírou glykolytické (fermentační) aktivity buněk. Jedná se o neinvazivní metodu měření živých buněk v reálném čase, a to jak suspenzních buněk, tak i adherentních buněk, sféroidů (3D), Langerhansových ostrůvků apod.

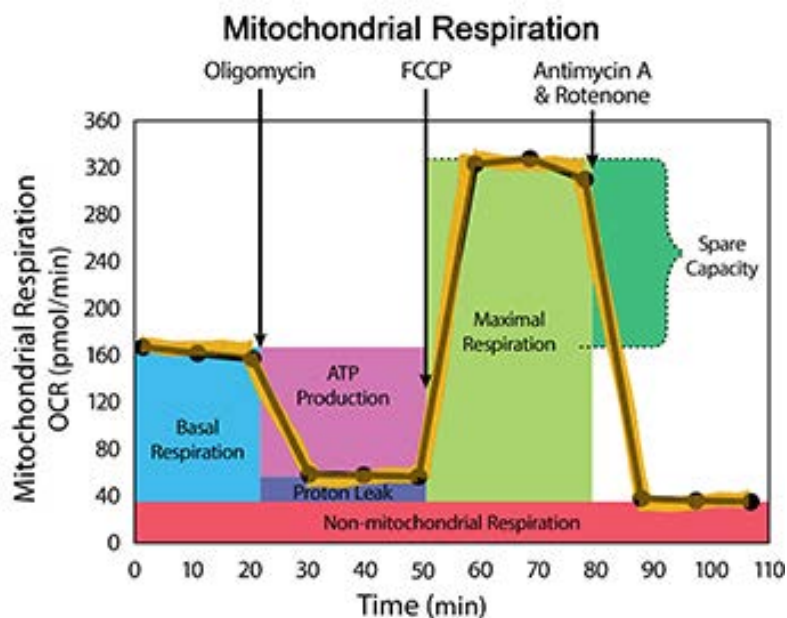
Ve spolupráci s odbornými specialisty z Dánska a oddělením Bioenergetiky z Fyziologického ústavu AV ČR jsme v říjnu 2016 uspořádali praktický jednodenní workshop na měření buněčného metabolismu technologií Seahorse Extracellular Flux. V praktické části workshopu jsme sledovali mitochondriální profil v živých buňkách pomocí kity Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, který se používá jako zlatý standard pro měření parametrů mitochondriální funkce. Tímto měřením je možné odhalit kritické informace o mitochondriálním metabolismu, které nejsou na první pohled zjevné při měření bazálního metabolismu. Pro měření jsme použili přístroj Seahorse XFe 24 na pracovišti RNDr. Tomáše Mráčka, Ph.D. Součástí workshopu byly prezentace uživatelů Seahorse technologie, seznámení s novinkami v nabídce Seahorse XF a možnost diskuse s dánským specialistou. Proto se akce účastnili rovněž zkušení uživatelé.

V roce 2017 **plánujeme workshop** na technologii Seahorse začlenit do vícedenního komplexního semináře „**Seahorse and LC/MS workshop**“ v Biocevu (Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci).

Aktuální informace o pořádaných kurzech, workshopech a školeních či podrobnější informace o možnostech využití naší laboratoře najdete na našich internetových stránkách v sekci „Služby“ nebo nám své podněty, dotazy, přihlášky i předběžný zájem pište na dgg@hpst.cz nebo kontaktujte autorku příspěvku.

Michaela Pluskalová

michaela.pluskalova@hpst.cz



Obrázek 3

Měření parametrů mitochondriální funkce pomocí Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit

Opravdu kompletní řešení pro metabolomiku a integrovanou biologii od Agilent Technologies

Metabolomika je jedna z „omik“ (podobně jako *proteomika* nebo *genomika*) věnující se identifikaci a kvantifikaci všech malých molekul (metabolitů) přítomných v buňkách nebo tkáních živých organismů, tvořících tzv. metabolom. Změny v metabolomu mohou korelovat například se studovanou nemocí a rozdílové metabolity potom představují tzv. biomarkery, které lze použít pro diagnostiku nemoci nebo pro vývoj nových farmak k efektivní léčbě těchto onemocnění. Kromě klinického výzkumu nachází metabolomika uplatnění i v mnoha dalších oblastech jako je farmaceutický průmysl, zemědělství, potravinářství, zkoumání vlivu životního prostředí na organismy (tzv. *environmental metabolomics*) nebo v toxikologii.

Metabolity jsou extrémně různorodá skupina látek od polárních aminokyselin, organických kyselin, sacharidů nebo alkoholů až po velmi nepolární látky, jako jsou některé pigmenty, steroidní hormony, nebo lipidy. Neexistuje žádná technika, která umožňuje stanovit všechny metabolity najednou, takže v metabolomice nachází uplatnění celá řada separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Zde nabízí Agilent Technologies nejširší portfolio na trhu, od spojení hmotnostní spektrometrie s kapilární elektroforézou (CE/MS, viz článek *ChromAtoMol 3, str. 23*), přes kapalinovou chromatografii (HPLC), až po superkritickou fluidní chromatografii (SFC) a samozřejmě plynovou chromatografii (GC).

Kromě separace a detekce polárních

i lipofilních metabolitů hraje v metabolomice důležitou roli softwarové zpracování dat a zasazení výsledků do biologického kontextu, tj. identifikace metabolických cest, které byly nějakým způsobem ovlivněné. V metabolomice existují dva hlavní přístupy, které se mohou vzájemně doplňovat: necílená metabolomika a cílená metabolomika.

Necílená metabolomika (*discovery metabolomics*)

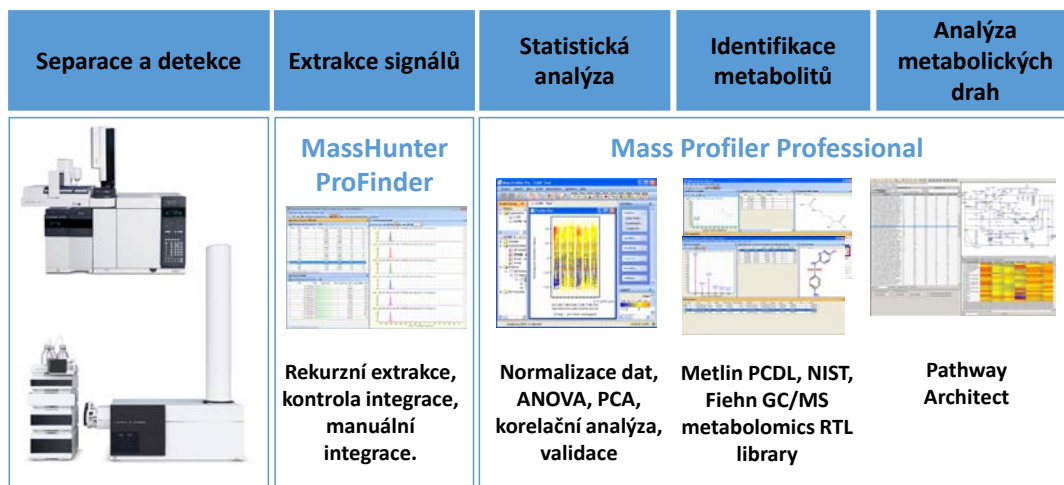
Necílená metabolomika se využívá pro hledání nových metabolitů/biomarkerů, které jsou u sledovaného organismu ovlivněny nemocí, novým léčivem apod. Z toho důvodu se zjišťují rozdíly v profilu všech metabolitů mezi testovanými a kontrolními vzorky. Celý postup od akvizice dat až po získání výsledků je znázorněn na **Obrázku 1**. Vzhledem k tomu, že není dopředu známo, jaké analyty jsou pro nás důležité, je nutno využívat instrumentaci vhodnou pro necílenou analýzu. Zde se uplatňují hmotnostní spektrometry s vysokým rozlišením a určením přesné hmoty (TOF, QTOF), které umožňují necílené hledání sloučenin ve vzorku a jejich kvalitní identifikaci.

Jeden z hlavních a nejdůležitějších kroků v necílové metabolomice představuje extrakce chemických signálů – látek (tzv. *peak picking* nebo *feature finding*, o kterém jsme psali v minulém čísle *ChromAtoMol* u necílené analýzy (viz článek *ChromAtoMol 3, str. 29*).

- **Metabolom:** souhrn všech metabolitů, které jsou v živém organismu přítomny za daných podmínek.
- **Rekurzní extrakce:** Při necílené extrakci píků/látek z MS dat je vždy potřeba nastavit nejnižší signál, který nás zajímá (threshold). Často však dojde k tomu, že z některých vzorků nelze signál molekuly získat, protože je slabý a je pod nastavenou úrovní. Chybějící signály pak způsobují problémy v následné statistické analýze. Rekurzní extrakce spočívá v tom, že ze všech látek nalezených napříč všemi vzorky se vytvoří seznam, který je cíleně prohledáván, ale v tomto případě už s nulovým thresholdem. Tímto způsobem se eliminují falešně negativní nálezy a také je dosaženo lepšího statistického vyhodnocení díky absenci nulových signálů.
- **Metlin PCDL pro metabolomiku:** Offline verze internetové metabolomické knihovny, kterou jako jediná firma nabízí Agilent Technologies. Obě verze, webová i offline obsahují produktová spektra 9400 metabolitů získaná za standardizovaných podmínek na LC/QTOF MS Agilent Technologies.

Obrázek 1

Postup pro nečlenou metabolomiku pomocí nástrojů Agilent Technologies: Po akvizici dat (LC/MS nebo GC/MS) následuje nečíslová extrakce signálů v software MassHunter ProFinder, statistická analýza, identifikace metabolitů pomocí knihoven a interpretace dat v biologických procesech. LC/MS a GC/MS data mohou být analyzována dohromady ve stejném software a stejném projektu.



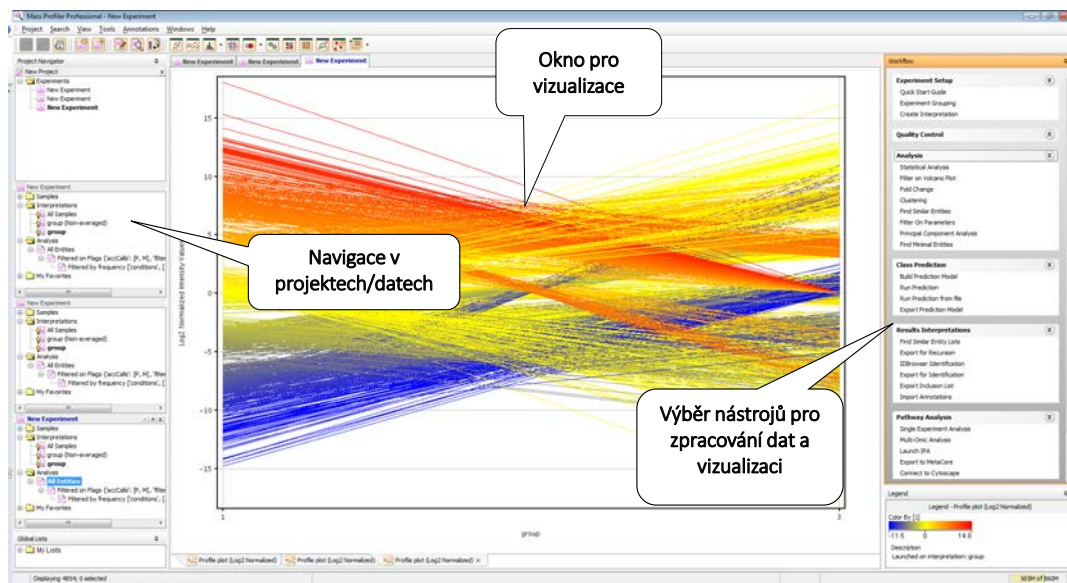
V tomto kroku je nezbytné získat z naměřených dat co nejvíce reálných metabolitů a naopak minimalizovat extrakci náhodného šumu. Protože metabolické studie obvykle pracují se spoustou vzorků z několika skupin, aby bylo možné pokrýt biologickou variabilitu (často studie zahrnují stovky vzorků), vyvinul Agilent Technologies pro extrakci chemických signálů specializovaný program **Mass Hunter ProFinder**, který umožňuje zpracování LC (CE, SFC)/MS i GC/MS dat, včetně rekurzivní extrakce, manuální kontroly/úpravy integrace píků a zarovnání dat podle m/z a retenčního času. Díky tomu je dosaženo maximální kvality vstupních dat pro statistickou analýzu.

Dalším krokem je samotná statistická analýza,

jejímž cílem je výběr signálů/látek, které jsou mezi sledovanými skupinami významně odlišné. I když statistická analýza spousty analytických chemiků upřímně děsí, základní diferenční analýza je poměrně jednoduchá a software **Mass Profiler Professional (MPP)** navíc obsahuje průvodce, který nováčky celým postupem provede krok za krokem. MPP je primárně určený pro chemiky, kteří ke své práci potřebují statistickou analýzu hmotnostně-spektrometrických dat, nabízí ale i řadu pokročilých testů z multivariační analýzy, vizualizace dat, tvorby a validace statistických modelů. **Obrázek 2** znázorňuje uživatelské rozhraní software Mass Profiler Professional (MPP).

Obrázek 2

Ukázka obrazovky software Mass Profiler Professional, který je zaměřen na statistickou analýzu hmotnostně-spektrometrických dat



Věděli jste, že?

- Knihovna Metlin pro metabolomiku je v systémech Agilent dostupná jako místní kopie bez nutnosti vyhledávání na webu
- Obsahuje produktová spektra pro 9400 látek
- Produktová spektra v internetové knihovně Metlin jsou naměřena na Agilent LC/MS QTOF

Získané rozdílové metabolity je potom nezbytné identifikovat, aby mohly být namapovány na biologické dráhy. MPP umožňuje pro všechny metabolity, nebo pro ty vybrané na základě statistické analýzy, vypočítat sumární vzorec a také využívá k identifikaci všechny knihovny spekter, dostupné pro hmotnostní spektrometry Agilent. Pro účely metabolomiky je to především LC/MS knihovna **Metlin¹**, **NIST** a **GC/MS metabolická knihovna** vyvinutá Oliverem Fiehnem. Vše je velmi jednoduché, protože celý proces probíhá v jednom software, data se nemusí nikam přesouvat a je možné celý postup automatizovat.

Posledním krokem je zasazení výsledků do biologického kontextu, tedy zjištění, které metabolické dráhy jsou ve sledovaném organismu ovlivněny. Pro tento účel obsahuje MPP modul označovaný jako **Pathway Architect**, který komunikuje s databázemi metabolických drah (např. WikiPathway, BioCyc nebo KEGG).

Celý princip spočívá v tom, že jsou identifikovány metabolické dráhy, ve kterých se vyskytují zjištěné regulované metabolity. I když se proces mapování metabolitů na biologické dráhy může zdát jako poměrně jednoduchý, ve skutečnosti je pro funkční řešení nutné

překonat jeden nečekaný problém: různé databáze – ať už biologických drah nebo spektrální knihovny – mohou označovat stejnou chemickou látku různými jmény, případně obsahují několik různých záznamů, které se týkají stejného metabolitu. Například *Human Metabolite Database* (HMDB) obsahuje 23 různých označení pro D-glukózu. Řešením tohoto problému je „překladač“, který umí propojit záznamy týkající se stejné látky mezi jednotlivými databázemi. Tento překladač se jmenuje **Agilent-BridgeDB** a i když pracuje na pozadí **Pathway Architect** a není vidět, je srdcem celého systému.

Cílená metabolomika

Cílená metabolomika, jak už vyplývá z názvu, se zaměřuje na sledování vybraných metabolických drah. Cílem je obvykle přesná kvantifikace prekurzorů a produktů, takže se vedle hmotnostních spektrometrů typu QTOF využívají i trojitě kvadrupóly (QQQ). Cílená metabolomika se často používá pro validaci výsledků získaných necílenou metabolomikou, tedy k potvrzení relevance nalezených biomarkerů na větším počtu vzorků.

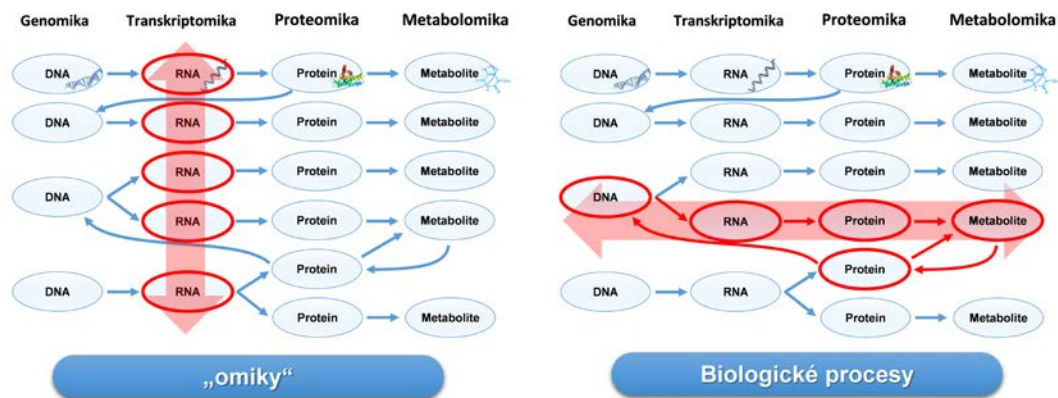
Multi-omická analýza – integrovaná biologie

Omics přístupy využívají data z analýzy malých molekul (**metabolomika**), proteinů (**proteomika**) a genomu (**genomika**, **transkriptomika**) pro studium živých systémů. Výsledky těchto dílčích studií se často realizují samostatně a postrádají celkový pohled na biologický proces, který zdaleka není přímý od DNA, přes RNA k proteinu, případně metabolitu (**Obrázek 3**).

Kombinací dvou, nebo i více typů omických přístupů lze dosáhnout lepšího oddělení skutečně biologicky relevantních markerů – signálů – od těch, které sice mají dostačující statistickou významnost (liší se mezi skupinami vzorků), ale ve skutečnosti nesouvisí se sledovaným dějem. Například analýza kompletního genomu často vede k detekci miliónů „single-nukleotide variant“ (SNV), a zjistit, která změna je klíčová pro rozvoj onemocnění, je nesmírně obtížné. V případě, že se na stejných vzorcích provedou také proteomické nebo metabolické experimenty, lze získaná data navázat na metabolické dráhy a zjistit „průnik“ všech těchto experimentů. Tím lze do značné míry odfiltrout náhodné vlivy v každém experimentu a potažmo tak zvýšit odstup signálu (relevantní informace) od šumu (náhodné signály) pro omické experimenty².

Agilent Technologies má unikátní pozici v tom, že ve svém portfoliu zahrnuje nástroje pro genomiku, transkriptomiku, proteomiku i metabolomiku. Nabízí zároveň řešení, jak jejich výstupy kombinovat a interpretovat v kontextu biologických systémů. Tímto řešením je propojení software **GeneSpring** (transkriptomika) a **Mass Profiler Professional** pomocí modulu **Pathway Architect**. Ten umožňuje, podobně jako v případě metabolomiky, mapovat na biologické dráhy i proteiny, které danou dráhu katalyzují, případně geny, které nesou informaci o daném enzymu. GeneSpring a Mass Profiler Professional ve spojení s Pathway Architect tedy představují platformu, kde se setkávají molekulární biologové s (bio)chemiky.

Multi-omická analýza s využitím bioinformatického software Agilent Technologies byla využita v řadě studií. Příkladem může být studium vlivu radioaktivního záření na semena rýže ve Fukushimařské prefektuře³, výzkum retinoblastomu (zhoubný nádor oka)⁴ nebo glioblastomu (GBM), nejčastějšího primárního nádoru mozku⁵.



Obrázek 3
Znázornění principu „omics“ studií vs. biologických procesů

V tomto případě je důležitá možnost importovat nově změřená data do dříve vytvořeného statistického modelu a využít je pro potvrzení biomarkeru. Do MPP lze importovat nejen kvalitativní data z přístrojů QTOF, ale i kvantitativní data získaná ať již na QTOF nebo na QQQ systémech. Pro cílenou metabolomiku však existuje i softwarový nástroj **Pathway-to-PCDL**, který pro vybrané metabolické cesty (například navržené při experimentu necílené metabolomiky), sestaví databázi všech látek, které se v těchto drahách vyskytují. Taková databáze je potom využitelná pro cílenou, a tedy mnohem citlivější extrakci píků těchto látek, které by jinak necíleným přístupem nebyly detekovány.

Závěr

Metabolomika je populární a rychle se rozvíjející disciplína, která má potenciál přinést unikátní objevy v biologii, klinickém výzkumu, vývoji léčiv apod. Principy, postupy a softwarové nástroje využívané pro metabolomické studie jsou navíc použitelné i ve spoustě dalších oborů jako je analýza potravin, analýza životního prostředí a zemědělství. Klíčem k úspěchu necílené metabolomiky je získání maximálního množství kvalitních informací ze vzorku. Vzhledem k širokému spektru polarit metabolitů je nezbytné použít paralelně několik separačních technik, čímž se však vzorek frakcionuje a ztrácíme komplexní pohled. Metabolomické řešení firmy Agilent založené na platformě **Mass Profiler Professional** je unikátní tím, že umožňuje v rámci jedné studie integrovat data z různých separačních technik (LC, CE, GC) ve spojení s různými typy hmotnostních analyzátorů (QQQ, TOF, QTOF), ale i data získaná z dalších přístupů (genomika, proteomika). Lze tak získat kompletní obrázek o celém vzorku, nikoli o pouhé frakci metabolitů, které daná technika umožňuje separovat a detekovat.

Ondřej Lacina

ondrej.lacina@hpst.cz

Jitka Zrostlíková

jitka.zrostlikova@hpst.cz

Literatura:

1. Scripps Center for Metabolomics. . [online]. [cit. 2016-12-13]. Dostupné z: <https://metlin.scripps.edu/index.php>
2. Pathways to Insight. 2015(5991-0222EN).
3. HAYASHI, G. et al., A Multi-omic Approach to Reveal the Effect of Low-level Gamma Radiation on Rice Seeds. *Agilent Application Note*. 2016, (5991-6416EN).
4. NILANJAN, G. et al., Integrated Transcriptomics and Metabolomics Study of Retinoblastoma Using Agilent Microarrays and LC/MS/GC/MS Platforms. *Agilent Application Note*. 2015, (5991-6215EN).
5. DURAIRAJ, R. et al., Molecular Subtypes in Glioblastoma Multiforme: Integrated Analysis Using Agilent GeneSpring and Mass Profiler Professional Multi-Omics Software. *Agilent Application Note*. 2016, (5991-5505EN).

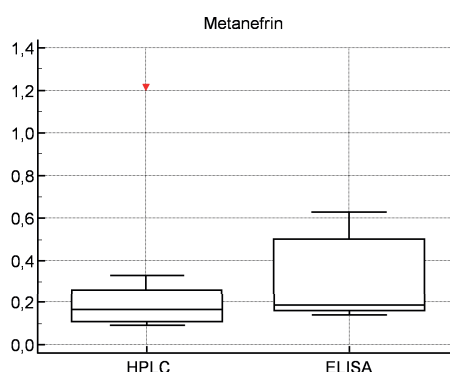
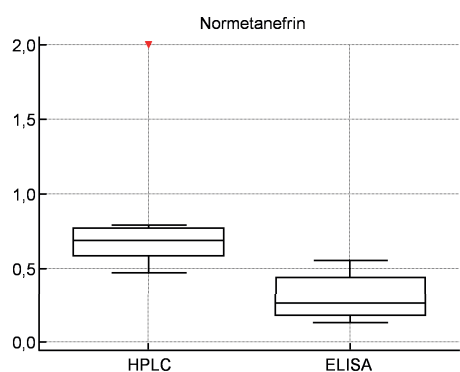
Stanovení volných plazmatických metanefrinů pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

Diferenciální diagnostika neuroendokrinních tumorů

Plazmatické metanefriny, metanefrin a normetanefrin, jsou 3-O-methylované metabolity katecholaminů, které zauímají důležité místo v diferenciální diagnostice neuroendokrinních onemocnění. Neuroendokrinní nádory představují různorodou skupinu onemocnění s různou klinickou symptomatologií a etiopatogenezí a jejich včasná diagnostika je zcela zásadní pro léčbu a chirurgickou intervenci. Postup při diagnóze neuroendokrinních nádorů je založen na několika aspektech – na klinické symptomatologii, na laboratorní diagnostice a na zobrazovacích technikách. Neuroendokrinní nádory, které pocházejí z chromafinní tkáně sympatického nebo parasympatického nervového systému, jako jsou feochromocytom nebo paragangliom, vykazují setrvalou nebo paroxyzmální nadměrnou produkci katecholaminů. Laboratorní průkaz nadprodukce katecholaminů tumorem je limitován řadou faktorů jako např. nespecifické zvýšení hodnot v důsledku sekundárního stresování

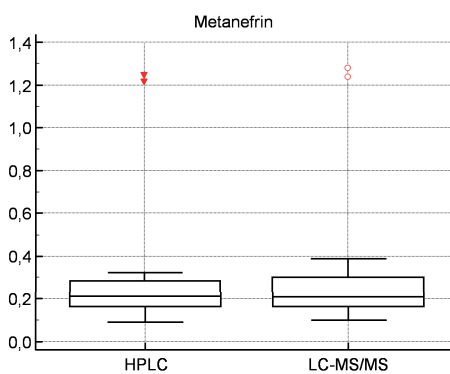
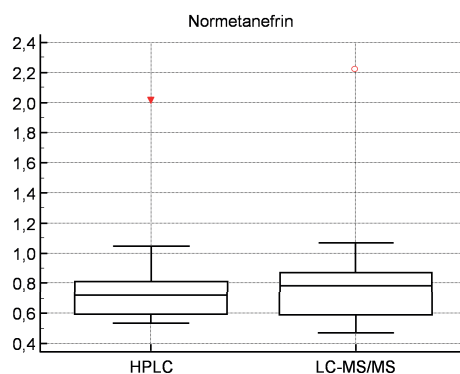
při odběru, nedodržením dietního opatření či zkreslením výsledků přítomností němých feochromocytomů. Důležitým aspektem pro laboratorní diagnostiku je plynulá a nezávislá produkce metanefrinů nádorovými buňkami. Metanefrin a normetanefrin jsou preferovány pro diferenciální diagnostiku feochromocytomu vzhledem k jejich vysoké diagnostické senzitivitě a specifitě.

V laboratorní diagnostice je pro stanovení volných plazmatických metanefrinů využíváno několik metod. Často se používají metody klasické kapalinové chromatografie s následnou spektrofotometrickou, fluorimetrickou či elektrochemickou detekcí. Tyto metody však vyžadují poměrně náročnou přípravu vzorku a delší chromatografii pro separaci interferujících látek. U metod využívajících plynovou chromatografii je zase nutná derivatizace analytů pro převedení na jejich těkavou formu. Imunoanalytické metody pro stanovení plazmatických metanefrinů jsou sice jednoduché a rychlé, ovšem jejich výsledky mohou být ovlivněny křížovými reakcemi s dalšími látkami.



Obrázek 1

Grafické znázornění koncentrací normetanefrinu (graf vlevo) a metanefrinu (graf vpravo) v plazmě stanovených pomocí IVD kitu pro HPLC s elektrochemickou detekcí a IVD kitu využívajícího ELISA (n = 11)



Obrázek 2

Grafické znázornění koncentrací normetanefrinu a metanefrinu v plazmě stanovených pomocí IVD kitu pro HPLC s elektrochemickou detekcí a vyvinuté LC-MS/MS metody (n = 24)

Co nás vedlo k vyvinutí LC-MS/MS metody pro stanovení volných metanefrinů v plazmě?

V diagnostické laboratoři Spadia a.s. jsme využívali pro kvantitativní stanovení plazmatických metanefrinů IVD kit (in vitro diagnostický kit) na principu ELISA. Později se na trhu objevil IVD kit určený pro HPLC systémy s coulometrickou detekcí, který však vyžadoval poměrně složitou implementaci do rutinního provozu. Proto jsme se rozhodli porovnat ELISA a HPLC metodiky pro stanovení plazmatických metanefrinů pro potřeby privátní laboratoře. Testování odhalilo významné rozdíly v kvantitativních výsledcích obou metod (viz Obrázek 1).

Toto zjištění nás vedlo k rozhodnutí zavést metodu založenou na chromatografickém přístupu. Omezením klasické HPLC metody je ovšem náročná příprava vzorků a dlouhý čas analýzy. Příprava série vzorků pro stanovení HPLC trvá okolo 2 hodin, vyžaduje krok extrakce na tuhou fázi (SPE), odpařování elučního činidla a i samotná analýza je časově velmi náročná (doba analýzy jednoho vzorku trvá okolo 50 minut). Nabízelo se však využití LC-MS/MS techniky, která díky vysoké selektivitě a citlivosti umožňuje přípravu vzorku značně zjednodušit a dobu analýzy výrazně zkrátit.

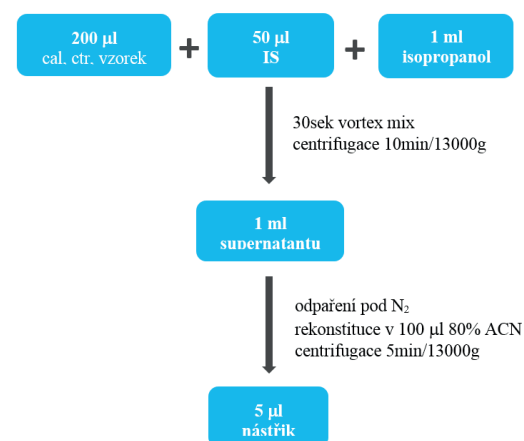
Cílem této práce byl vývoj a implementace rutinní metody stanovení volných metanefrinů v plazmě, která by eliminovala nevýhody klasických chromatografických technik i dříve využívané ELISA metody.

Vývoj a implementace LC-MS/MS metody pro stanovení volných metanefrinů v plazmě

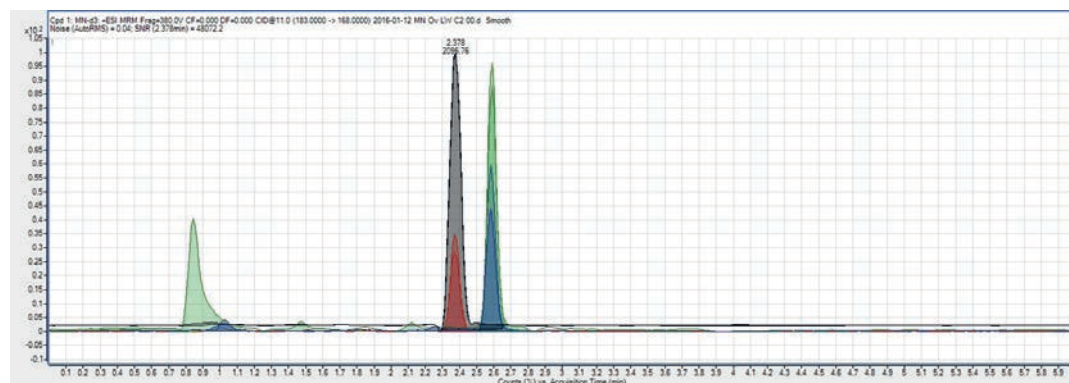
Příprava vzorků

Vyšetření se provádí ze vzorku plazmy odebrané do odběrové soupravy s antikoagulačním činidlem EDTA. Po odběru je nutné krev centrifugovat 10 min při 4000 g a získanou plazmu do okamžiku provedení analýzy uchovávat při -20 °C.

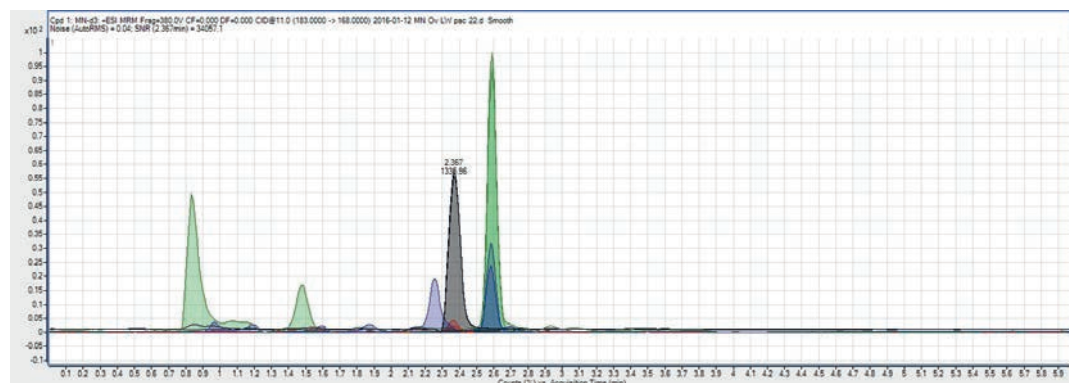
Příprava vzorku k analýze je nenáročná a nevyžaduje extrakci na pevné fázi (SPE). Ke vzorku jsou přidány deuterované standardy obou analytů, poté je provedena precipitace proteinů isopropanolem, odpaření pod proudem dusíku a rekonstituce ve 100 µl mobilní fáze.



Obrázek 3a
Stanovení volných metanefrinů v plazmě pomocí LC-MS/MS metody, chromatogram kontrolního vzorku



Obrázek 3b
Stanovení volných metanefrinů v plazmě pomocí LC-MS/MS metody, chromatogram patientského vzorku



LC-MS/MS metoda

Separace plazmatických metanefrinů probíhá na UHPLC systému Agilent 1290 Infinity, na koloně SeQuant@ZIC@HILIC HPLC 3,5 µm; 100 × 2,1 mm (Merck, Německo) a analyty jsou separovány gradientovou elucí mobilních fází skládající se z 50 mM vodného roztoku mravenčanu amonného a acetonitrilu při průtoku 0,3 ml/min a teplotě 45 °C. Analyty jsou detekovány na hmotnostním spektrometru Agilent 6490 Triple Quadrupole (parametry iontového zdroje a MRM přechody jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2). Celková doba analýzy je 6 min a retenční časy separovaných analytů jsou 2,4 min pro MN a 2,6 min pro NMN (Obrázek 3a, 3b).

Porovnání vyvinuté LC-MS/MS metody s kitem pro HPLC

Vyvinutá metoda byla testována na pacientských vzorcích a data byla porovnána s daty

získanými z kitu pro HPLC. Z Obrázku 2 je patrné, že LC-MS/MS metoda poskytovala obdobné výsledky jako HPLC metoda s coulometrickou detekcí. Z pohledu náročnosti na přípravu vzorků a délky chromatografické separace však představuje LC-MS/MS metoda významnou úsporu času a nákladů na analýzu.

Rozsah kalibrace vyvinuté metody pro metanefrin je 0,035 – 7,175 nmol/l (Obrázek 4) s limitem kvantifikace 0,035 nmol/l (CV = 4,8 %) a rozsah kalibrace pro normetanefrin je 0,049 – 9,956 nmol/l (Obrázek 5) s limitem kvantifikace 0,049 nmol/l (CV = 6,7 %). Výtěžnost, určená metodou standardního přidavku se pohybovala v rozmezí 89 – 98 %. Variační koeficienty (CV) preciznosti v sérii a mezilehlé preciznosti se pohybovaly pod 10 % (viz Tabulka 3). Pro určení mezilehlé preciznosti byly použity dvě hladiny kontrolních materiálů ClinChek® for Metanephrines.

26

Agilent Jet Stream ESI	pozitivní mód
Teplota sušícího plynu	135 °C
Průtok sušícího plynu	12 l/min
Nebulizer	45 psi
Teplota fokusačního plynu	400 °C
Průtok fokusačního plynu	10 l/min
Napětí ESI	4000 V
Napětí trysky (Nozzle)	0 V

Tabulka 1
Parametry iontového zdroje

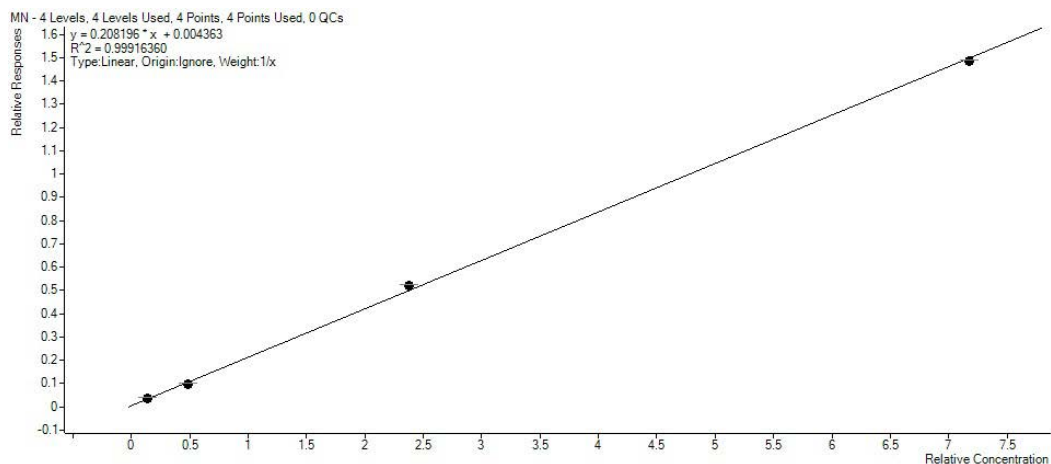
Analyt	Kvantifikační MRM přechod			Kvalifikační MRM přechod		
	Prekurzor (m/z)	Produkt (m/z)	Kolizní energie (V)	Prekurzor (m/z)	Produkt (m/z)	Kolizní energie (V)
Metanefrin	180	165	11	180	148	11
Metanefrin-d3	183	151	11	183	168	11
Normetanefrin	166	134	14	166	106	18
Normetanefrin-d3	169	137	14	169	109	18

Tabulka 2
Tabulka MRM přechodů

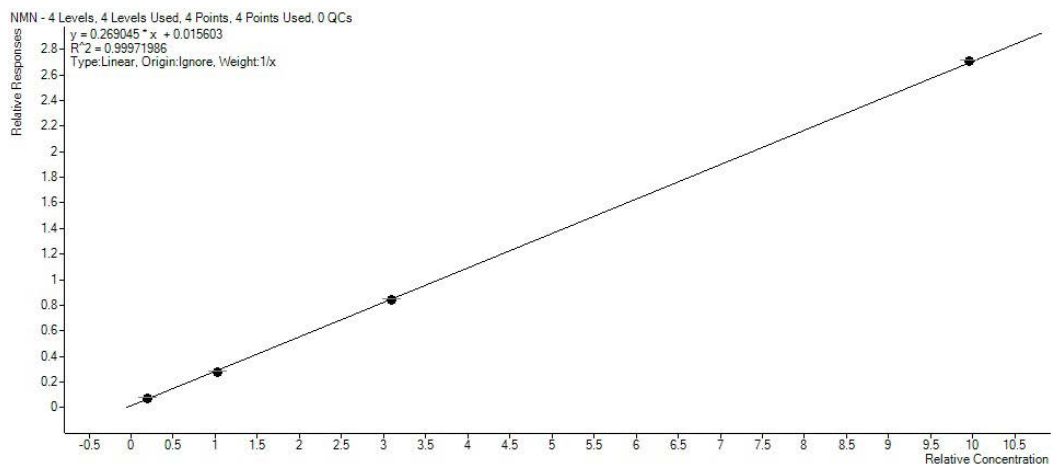
Preciznost	Jednotky	Preciznost v sérii (n=12)		Mezilehlá preciznost (n=20)			
		Metanefrin	Normetanefrin	Metanefrin		Normetanefrin	
				Level 1	Level 2	Level 1	Level 2
C _{teor}	nmol/l	-	-	0,295	1,207	0,628	2,079
MEAN	nmol/l	0,118	0,778	0,295	1,212	0,630	2,200
SD	nmol/l	0,006	0,019	0,012	0,049	0,051	0,205
CV	%	5,4	2,4	4,2	4,1	8,1	9,3

Tabulka 3
Preciznost v sérii a mezilehlá preciznost

Obrázek 4
Kalibrační křivka pro metanefrin v plazmě



Obrázek 5
Kalibrační křivka pro normetanefrin v plazmě



Závěrem

Prezentovaná LC-MS/MS metoda poskytuje vyhovující analytické parametry pro oba analyty. Srovnání výsledků s HPLC metodou potvrdilo vhodnost použití tohoto postupu pro stanovení volných metanefrinů v plazmě v rutinní diagnostické laboratoři. Zavedením LC-MS/MS metody do rutinního provozu laboratoře byla významně zjednodušena příprava vzorku a zkrácen čas analýzy z 50 min na 6 min.

Magdalena Rajska
SPADIA LAB, a.s.
magdalena.rajska@spadia.cz

Petra Prochazková
SPADIA LAB, a.s.
petra.prochazkova@spadia.cz

SPADIA LAB, a.s.

Kdo jsme?

SPADIA LAB, a. s., jsou moderní diagnostické laboratoře v českých rukou řízené zkušenými laboratorními odborníky s dlouholetou praxí, pro které je vysoká kvalita výsledků a dobré jméno společnosti tou nejdůležitější hodnotou.

Jsme zaměřeni na primární péči, tj. praktické lékaře, ale i specialisty a díky velkému spektru laboratorních metod spolupracujeme i s řadou lůžkových zařízení, včetně fakultních nemocnic.

V čem jsme výjimeční

Komplexní služby - jeden partner pro rutinní i vysoce specializovaná vyšetření

Vysoce kvalifikovaní odborníci – záruka kvality

Antibiotické středisko - je součástí laboratoře klinické mikrobiologie. Činnost tohoto střediska je zaměřena na oblast laboratorní, konzultační, sledování nemocničních infekcí a edukační činnost.

Oddělení lékařské genetiky – našim klientům nabízíme klasické cytogenetické a molekulárně-cytogenetické vyšetření – vyšetření chromozomových aberací, postnatální stanovení karyotypu. Dále provádíme diagnostiku monogenně podmíněných onemocnění a onkologických onemocnění. Mezi nově zařazená vyšetření patří TRISOMY test.

Centrum lékařské genetiky Frýdek – Místek – poskytuje komplexní poradenství týkající se dědičných onemocnění. Provádíme syndromologická vyšetření, prenatální poradenství, genetické konzultace v rámci reprodukční medicíny, onkologické konzultace a jiné odborné genetické konzultace.

Oddělení instrumentálních metod - na tomto oddělení jsou využívány speciální technologie. Přístrojové vybavení dovoluje využití analytických metod kapalinové chromatografie ve spojení s různými typy detekce (UV/VIS, DAD, fluorescenční, elektrochemické, MS/MS), plynové chromatografie s MS detekcí, AAS a ICP-OES.

S využitím těchto moderních technologií, zejména pak hmotnostní spektrometrie, můžeme vycházet vstříc požadavkům našich klientů a zajistit jim komplexnost služeb v rámci laboratorní medicíny.

Prováděná vyšetření:

- Terapeutické monitorování léčiv – antibiotika, antiepileptika, antihypertenziva, antiarytmika
- Biogenní aminy a jejich metabolity
- Steroidní hormony
- Vitamíny
- Ionty, stopové prvky, toxické prvky
- Toxikologie – screening i konfirmace
- Diagnostika porfyrií
- Další – kyselina methylmalonová, homocystein

www.spadia.cz

Agilent 1260 Infinity II: nová generace kapalinových chromatografů



Obrázek 1
Agilent 1260 Infinity II s Vialsam-
plerem



Obrázek 2
Agilent 1260 Infinity II s Multisam-
plerem

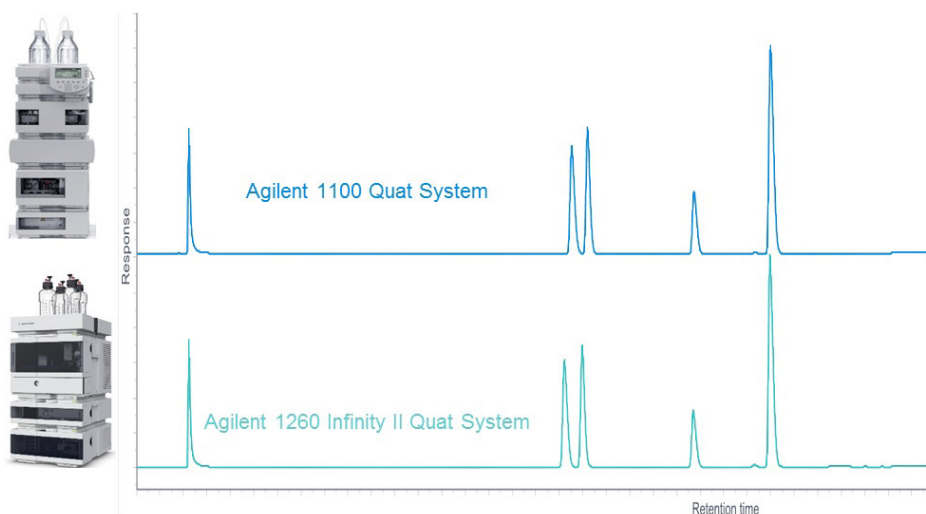
Spolehlivost a robustnost. Pojmy, které jsou již více jak 40 let úzce spojeny s kapalinovými chromatografy firmy Agilent Technologies. Historie kapalinových chromatografů se začala psát již v roce 1973 představením systému HP 1010 který vážil více jak 500kg. Během následujících let se systémy zmenšovaly, zrychlovaly, modularizovaly a tento vývoj vyvrcholil v roce 1995 uvedením dnes již legendární HP 1100. Tato platforma si díky své spolehlivosti a modularitě získala srdce nejednoho chromatografisty a právem se stala nejrozšířenějším kapalinovým chromatografem na světě. Jenom v České republice HPST eviduje více jak 350 instalovaných systémů. Tyto kapalinové chromatografy díky svým vlastnostem najdete v drtivé většině státních kontrolních laboratořích, farmaceutických laboratořích, environmentálních laboratořích, v nemocnicích ale také samozřejmě na univerzitní půdě. Rok 2016 je opět rokem přelomovým. Firma Agilent Technologies dovršila kompletní obměnu portfolia kapalinových chromatografů, která začala již na konci roku 2014 představením systému 1290 Infinity II, o kterém jsme Vás informovali ve druhém čísle tohoto časopisu.

Tato nová generace kapalinového chromatografu **Agilent 1260 Infinity II** je díky své modulární koncepci s největším spektrem chromatografických modulů určena pro všechny typy aplikací v klasické konvenční chromatografii. Zároveň díky tlakovému rozsahu až do 600 bar Vám tento systém přináší možnost

urychlit analýzy, ušetřit rozpouštědla a to vše bez ztráty rozlišení a s velkým důrazem na minimální disperzi.

Zpětná kompatibilita s předchozími generacemi HPLC systémů je jeden ze zásadních požadavků našich uživatelů. Vývojové oddělení firmy Agilent Technologies si tento požadavek plně uvědomuje a proto při vývoji nových generací modulů klade na zpětnou kompatibilitu maximální důraz. U kapalinových chromatografů Agilent není žádný problém postupně upgradovat HPLC systém z roku 1995 novými moduly z roku 2016 a zároveň dosáhnout 100% kompatibility převáděných metod. Jedná se o jedinečnou zpětnou kompatibilitu, kterou Vám žádná jiná firma neposkytne.

Jako názorný příklad této zpětné kompatibility může posloužit transfer klasické konvenční metody stanovení antihistaminik z kvartérního systému Agilent 1100 na kvartérní systém Agilent 1260 Infinity II. Ze srovnávacího chromatogramu je jasně patrné excelentní zachování rozlišení a retenčních časů. Jak již bylo výše napsáno, tlakový rozsah až 600 bar umožňuje uživatelům analýzy také zkracovat a to bez ztráty rozlišení díky čemuž ušetří nejen čas, ale především rozpouštědla. Podrobněji je toto popsáno v aplikační nótě pod číslem 5991-6914EN, která je volně k dispozici na webových stránkách firmy Agilent Technologies. Podívejme se nyní trochu podrobněji co vše Vám generační obměna u jednotlivých modulů přináší.



Obrázek 3
Srovnání retenčních časů a rozli-
šení

Čerpadla

Nová generace **čerpadel** doznala hned několika zajímavých inovací. Nově všechny typy čerpadel mohou využít integrovaného degasseru mobilní fáze. Díky této integraci dojde k redukci výšky celého systému což ocení především méně vzrostlí chromatografisté. Isokratické čerpadlo nově obsahuje integrovaný 3-kanálový přepínací ventil díky kterému můžete automatizovaně přepínat mezi 3 mobilními fázemi. Kvartérní čerpadla patří bezpochyby k nejrozšířenějším a nejoblíbenějším typům čerpadel. Nová generace těchto čerpadel převzala celou řadu moderních technologických inovací od nejvyšší modelové řady 1290 Infinity II.



Obrázek 4
Kvartérní čerpadlo

Autosamplery

S novou generací přichází řada novinek také u autosamplery. S ohledem na aplikační požadavky v kombinaci s množstvím analyzovaných vzorků, Vám nově můžeme nabídnout hned 2 nové produkty.

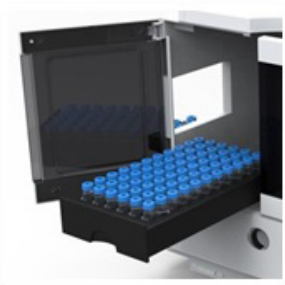
Nový **Vialsampler** je určený především pro standardní uživatele využívající klasické 2ml vialky. Externí oplach nástříkové jehly pro zajištění minimálního nežádoucího přenosu mezi jednotlivými analýzami je oproti předchozí generaci, která k oplachu využívala uživatelem definovanou vialku s rozpouštědlem, nově zajišťován externím rozpouštědlem díky čemuž je dosaženo daleko lepších hodnot pro tento klíčový parametr.



Obrázek 5
Vialsampler

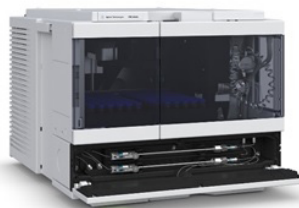
Oproti předchozí generaci došlo k navýšení kapacity na 132 vialek, které jsou nově umístěny ve dvou samostatných zásobnících, umožňující uživatelům dodávat vialky na zásobníku také v průběhu běžících analýz. Zcela nový koncept doznalo chlazení vzorků. Firma Agilent Technologies u nové generace upouští od modulu, který zajišťoval cirkulaci vzduchu v autosamplery, a nově k chlazení vzorků využívá minikompressoru, který je

umístěn přímo v modulu vialsamplery. Tento minikompressor je možné kdykoliv do netermostované verze vialsamplery dodat a uživatel tak může flexibilně reagovat na vzniklý požadavek chlazení vzorků.



Obrázek 6
Vialsampler, zásobník s vialkami

Největší novinkou u tohoto modulu je bezpochyby možnost **integrovaného termostatu kolon**. Jedná se o velice ekonomické řešení určené především pro uživatele, kteří nevyžadují ve svých metodách chladit chromatografické kolony. Termostat pojme až 2 chromatografické kolony a může být vybaven novou generací čtečky chromatografických kolon, která slouží jak ke sledování historie kolon, tak ji maximálně využijí také začínající chromatografisté. Identifikační systém kolon dokáže Vaši kolonu ochránit před aplikací nekompatibilních podmínek a zabránit tak mnohdy nevratnému poškození kolony.



Obrázek 7
Vialsampler s otevřeným integrovaným termostatem kolon

Kromě vialsamplery firma Agilent Technologies nabízí také sofistikovanější verzi autosamplery, která je určena pro chromatografisty, potýkající se s těmi nejnáročnějšími analytickými výzvami při nástříku vzorku. Tento autosampler nese nově název **Multisampler**. Tato verze obsahuje celou řadu revolučních řešení, které z tohoto autosamplery dělají naprosto unikátní a nejflexibilnější autosampler na trhu.



Obrázek 8
Multisampler

Ve své základní konfiguraci disponuje kapacitou 108 vialek kterou je možné v případě potřeby rozšířit až na neuvěřitelných více jak 6000 pozic a to vše bez nutnosti rozšiřování autosampleru o další externí modul. Autosampler je určený jak pro klasické vialky tak mikrotitrační destičky. Díky unikátní možnosti zapojení dvou nezávislých jehel („Dual Needle“) můžete výrazně urychlit nástřik, oddělit od sebe vzorky standardů a vzorků nebo nastříkat diametrálně rozdílné objemy bez manuálního zásahu do systému.

Termostaty kolon

Mnoho změn doznal také termostat kolon. I zde došlo k přejmenování tohoto modulu a nově nese název **Multicolumn Thermostat**. Termostat funguje na principu Peltiera s možností chlazení a ohřevu bez nuceného oběhu vzduchu. V porovnání s předchozí generací máte nově možnost připojit ke každé koloně vlastní předohřev mobilní fáze tzv. Quick-Connect Heat Exchangers. Kombinace nového typu ventilu který umožňuje automatizovaně přepínat mezi čtyřmi chromatografickými kolonami, nové generace identifikačního systému kolon a dvou oddělených teplotních zón představuje nejflexibilnější řešení pro uživatele zabývající se vývojem chromatografických metod.



Obrázek 9
Multikolonový termostat kolon

Detektory

Novou generaci **UV a DAD detektorů** spojuje jeden charakteristický prvek. Všechny detektory nově disponují maximální rychlostí sběru dat až 120 Hz. Pomineme-li fakt že se jedná o nejrychlejší detektory ve své třídě do 600 bar, umožňují Vám tyto detektory díky širokému rozsahu vlnových délek, velkému výběru průtočných cel, proměnlivé optické štěrbině a mnoha jiným důležitým parametřům, pokrýt kompletní aplikační požadavky v klasické chromatografii.



Obrázek 10
DAD detektor

Kromě klasických UV a DAD detektorů nabízí nová generace Infinity II také celou řadu speciálních detektorů jako jsou například RI, FLD nebo ELSD detektory. Z této skupiny jsou **fluorescenční detektory** bezpochyby nejrozšířenější. Díky moderní xenonové flash lampě a největšímu rozsahu vlnových délek na trhu představují tyto detektory nejlepší volbu, jak pro rutinní laboratoře zabývající například stanovením polyaromatických uhlovodíků, tak pro vědecko-výzkumné laboratoře, které ocení především nejširší rozsah vlnových délek, který je nebude omezovat v žádné aplikaci. **ELSD detektory** se stále více dostávají do chromatografického povědomí a nahrazují refraktometrické detektory především díky výrazně větší citlivosti a možnosti využití gradientových profilů.



Obrázek 11
ELSD detektor

Nová generace 1260 Infinity II přináší do kategorie systémů s tlakovým limitem 600 bar celou řadu moderních technologických inovací. Díky tomu se systém 1260 Infinity II stává tou nejlepší volbou jak pro současné uživatele starších kapalinových chromatografů Agilent, tak pro nové potenciální uživatele kteří od HPLC systému očekávají především spolehlivost a robustnost.

Jan Kovář
jan.kovar@hpst.cz

Automatické stanovení Δ^9 -Tetrahydrocannabinolu (THC) a jeho metabolitů v krevním séru pomocí SPE-GC/MS

THC je hlavní psychoaktivní látkou v rostlinách konopí. Například v Německu stačí pro odebrání řídičského průkazu stanovení koncentrace THC nad 1 ng/ml v krevním séru. Po konzumaci je THC metabolizováno na aktivní metabolit 11-hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-OH) a dále pak na neaktivní metabolit 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Ze stanovených koncentrací metabolitů THC lze zjistit další zajímavé informace o užití THC – vysoká koncentrace THC-OH ukazuje na nedávné užití konopí, vysoký obsah THC-COOH pak indikuje časté užívání konopí.

Instrumentace

Příprava vzorků byla provedena na aparatuře Gerstel sestavené z MultiPurpose Sampler (MPS) v provedení dual head, vybaveném modulem Solid Phase Extraction (SPE) a MultiPosition Evaporation Station (mVAP). Samotné měření bylo provedeno na plynovém chromatografu Agilent 7890 a hmotnostním spektrometru Agilent 5977. Levá věž MPS byla vybavena stříkačkou o objemu 10 μ L pro nástřik do inletu, zatímco pravá věž byla opatřena stříkačkou o objemu 2.5 mL pro dávkování všech rozpouštědel, kromě přídavku derivatizačního činidla N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamidu (MSTFA). Celý proces byl řízen kontrolním software Gerstel Maestro, který lze

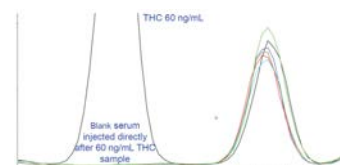
snadno integrovat do Agilent Chemstation a Agilent MassHunter. Nástřik vzorků byl realizován prostřednictvím horkého split/splitless inletu na kolonu.

Výsledky a diskuse

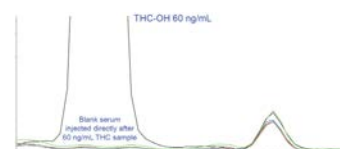
Jedním z kritérií bylo porovnání výsledků stávající a nové automatické metody. K tomuto účelu bylo analyzováno 5 vzorků krevního séra s přídavkem standardu THC na koncentrační úroveň blízkou detekčnímu limitu metody. Z grafu na Obrázku 3 vyplývá, že výsledky koncentrací THC jsou v souladu pro obě metody.

Dalším důležitým kritériem pro hodnocení automatické metody bylo stanovení carry-over. Bylo měřeno 6 vzorků krevního séra s přídavkem standardu na koncentrační úrovni 60 ng/ml THC, THC-OH a 600 ng/ml THC-COOH. Po každém vzorku byl změřen blank čistého séra. Jak je patrné z Obrázků 4a, 4b a 4c, u žádného ze stanovovaných analytů nebyl zjištěn měřitelný carry-over.

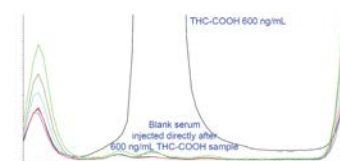
Použitá kalibrace byla provedena nástřikem rozpouštědlových standardů. Toto bylo možno provést jednak díky přítomnosti deuterovaných interních standardů pro každý analyt, jednak díky porovnání kalibračních křivek získaných měřením rozpouštědlové a matriční kalibrační řady (oba typy poskytovaly shodné křivky).



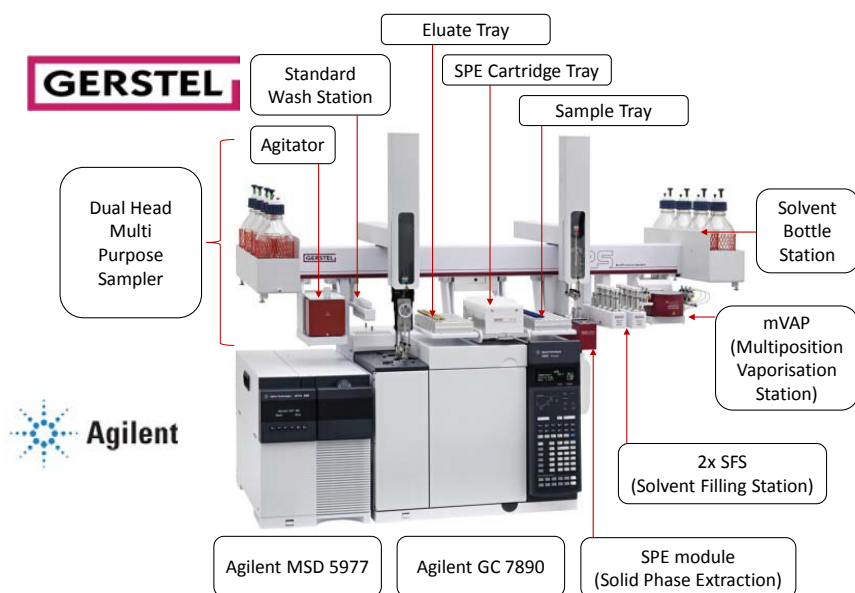
Obrázek 4a
Opakované měření blanku po nástřiku vzorku THC o koncentraci 60 ng/ml



Obrázek 4b
Opakované měření blanku po nástřiku vzorku THC-OH o koncentraci 60 ng/ml



Obrázek 4c
Opakované měření blanku po nástřiku vzorku THC-COOH o koncentraci 600 ng/ml



Obrázek 1
Systém pro automatickou analýzu THC a jeho metabolitů

Pracovní postup a příprava vzorků: Podmínky GC/MS analýzy:

Manuální přípravné kroky:

500 µL vzorku se naředí 500 µL 10% kyseliny octové a 50 µL roztoku interního standardu

Pokud je ve vzorku viditelná sraženina, vzorek se odstředí (tento krok lze také automatizovat)

Automatizované přípravné kroky:

SPE kolonka (1 mL, 100 mg C18ec) se nakondicionuje 2 ml každého rozpouštědla v tomto pořadí

- Methanol
- Deionizovaná voda
- 0.1 M kyselina octová

Celý vzorek (0.5 ml krevního séra) se převede na nakondicionovanou kolonku

Následně se SPE kolonka se vzorkem promyje 2 ml rozpouštědel v tomto pořadí

- 0.1 M kyselina octová
- Směs acetonitrilu (60/40 v/v)

SPE kolonka se vysuší proudem dusíku po dobu 1 minuty

Analyty se eluují 2 x 200 µL acetonitrilu

Eluát se odpaří dosucha při 60 °C, 100 mBar a třepání (250 rpm) po dobu 5 min v modulu mVAP

Odpařený vzorek se rozpustí ve 25 µL MSTFA při okolní teplotě, stálém míchání (750 rpm) po dobu 5 min

3 µL alikvot se nastříkne do horkého inletu, kde proběhne simultánní silylace analytů a transfer na GC kolonu

MPS: 3 µL injection volume

Teplota inletu: 280 °C

Inlet Liner: Deactivated, single taper (Agilent)

Injection Mode: Splitless, 2 min

Pneumatics: 134.5 kPa He, constant pressure

Oven:

- 160 °C (1 min); 10 °C/min;
- 180 °C (8 min); 5 °C/min;
- 220 °C (4 min); 15 °C/min;
- 270 °C (5 min); 10 °C/min;
- 300 °C (5 min)

Post Run: 325 °C (2 min), 350 kPa

Kolona: Agilent, VF-1ms 25 m, di = 0.2 mm, df = 0.33 µm

Transfer Line: 300 °C

Source Temp.: 230 °C

MSD Mode: Selected ion monitoring (SIM)

SIM Masses: m/z (THC): 386, 371, 303

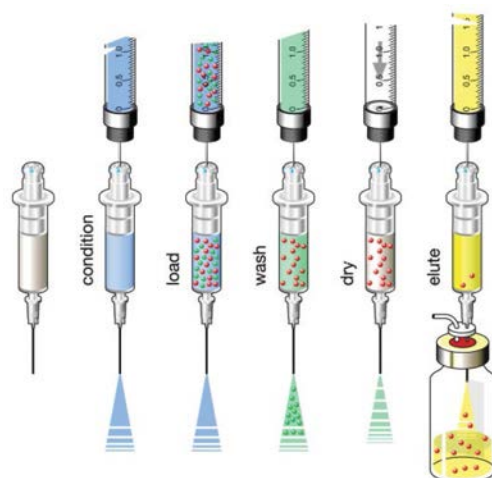
m/z (THC-D3): 389, 374, 306

m/z (THC-OH): 371, 474, 459

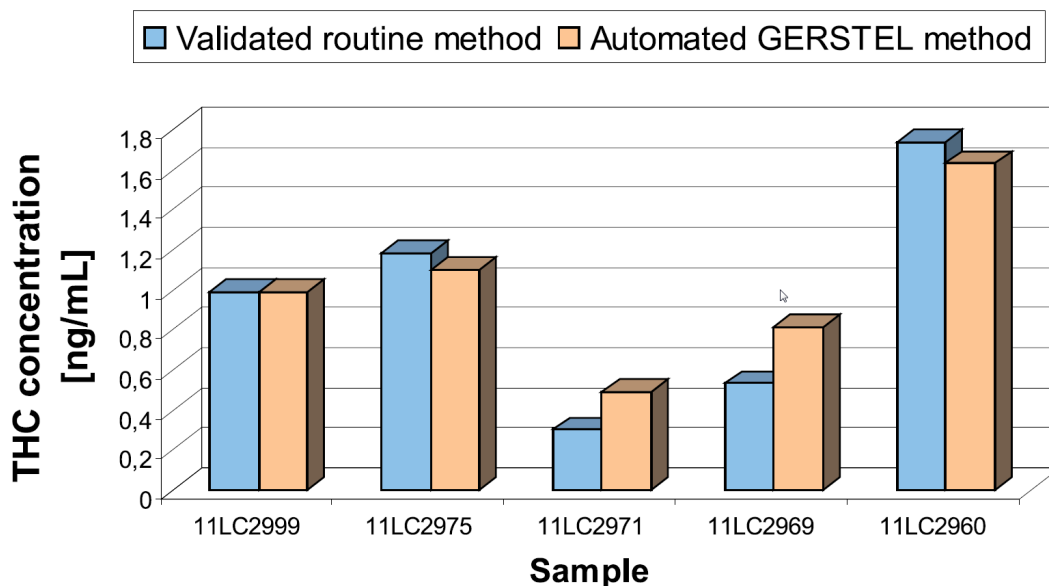
m/z (THC-OH-D3): 374, 477, 462

m/z (THC-COOH): 371, 473, 488

m/z (THC-COOH-D3): 374, 476, 491



Obrázek 2
Pracovní postup modulu Gerstel SPE



Obrázek 3
Porovnání analýzy výsledků THC získaných validovanou rutinní metodou a automatickou metodou Gerstel

Analyte	Limit of detection [ng/mL]	Limit of quantification [ng/mL]	Repeatability [%]			Inter-day Repeatability [%]			Extraction Efficiency [%]		
			1.2	5.5	25	1.2	5.5	25	1.2	5.5	25
			ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
THC	0.3	0.7	5.2	7.2	3.8	7.8	7.2	6.7	75	74	70
THC-OH	0.3	0.9	3.5	10	3.5	16.3	10	6.9	93	82	86
THC-COOH	<1	5	3.7	6.6	3.3	8.6	7.1	7.1	83	79	87

Tabulka 1
Naměřené validační charakteristiky pro metodu automatického stanovení THC a jeho metabolitů v krevním séru

Po srovnání manuální a automatické metody a po stanovení carry-over byly odhadnuty základní validační charakteristiky – limit detekce, limit kvantifikace, reprodukovatelnost, mezi-denní reprodukovatelnost a účinnost extrakce – viz Tabulka 1.

Závěr

Byla vyvinuta a validována plně automatická metoda pro stanovení THC a jeho hlavních metabolitů v krevním séru. Bylo dosaženo limitu kvantifikace pod 1 ng/mL pro THC a THC-OH, pod 5 ng/ml pro THC-COOH, reprodukovatelnosti výsledků měření v rozmezí 3.3 % – 10 % a extrakční účinnosti mezi 70 % - 93 %. Tyto výsledky byly dosaženy analýzou pouze 0.5 ml vzorku krevního séra (oproti standardní manuální metodě, kde se používá celý mililitr).

Michal Čaplygin
michal.caplygin@hpst.cz

Literatura:

LERCH, O. et al., Fully Automated SPE-GC/MS, Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and its Metabolites in Serum Samples. *Gerstel Application Note*. 2014, (AN/2014/02).

GERSTEL

Automatická příprava vzorků pro ty nejnáročnější

HPST, s.r.o., se nově stala autorizovaným distributorem společnosti Gerstel pro Českou republiku!

Gerstel se zaměřuje na vývoj a výrobu vysoce flexibilních řešení pro automatické dávkování

a přípravu vzorků pro plynovou a kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC/MS, LC/MS).

V případě zájmu nás neváhejte kontaktovat na emailu ivo.novotny@hpst.cz.



Twister / SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)

Patentované extrakční zařízení pro extrakci na pevnou fázi, kterou je pokryto magnetické míchadélko, umístěné ve vialce.



SPME (Solid Phase Micro Extraction)

Mikroextrakce na vlákno pokryté vhodným sorbentem. Desorpce probíhá přímo v GC inletu.



Selectable 1D/2D-GC/MS

Umožňuje rutinní jednodimenzionální GC/MS analýzu, kterou lze snadno přepnout na dvojdimenzionální.



ODP (Olfactory Detection Port)

Olfaktorické sledování látek, které opouštějí GC kolonu. Frakce jsou sledovány současně nosem i GC detektorem.



DHS (Dynamic Headspace)

Automatizovaný dynamický headspace a termální desorpce ve 20 ml headspace vialkách.



CIS (Cooled Injection System)

Univerzální GC inlet typu PTV pro všechny nástříkové módy včetně kryonástříku.



mVAP (MultiPostion Evaporation Station)

Plně automatizovaný systém pro odpařování rozpouštědel, integrovaný do MPS



TDU 2 (Thermal Desorption Unit)

Multifunkční automatizovaný systém pro termální desorpci a termální extrakci.



SPE (Solid Phase Extraction)

Automatizovaná extrakce na tuhou fázi pro GC/MS a LC/MS, nebo jako samostatný systém.



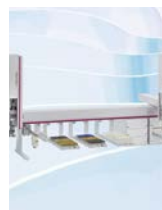
PYRO (Pyrolysis Option)

Automatizovaná pyrolýza pro Gerstel TDU. Poskytuje maximální flexibilitu a produktivitu.



MPS liquid, MPS robotic (MultiPurpose Sampler)

Multifunkční systémy pro přípravu vzorku a následný nástřík vzorku do GC/MS nebo LC/MS.



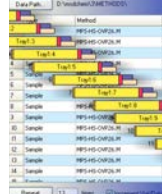
MPS DualRail PrepStation

Duální varianta MPS pro rozšíření možností přípravy vzorků.



ALEX (Automated Liner EXchange)

Systém pro automatizovanou výměnu GC linerů pro Gerstel CIS.



MAESTRO Software

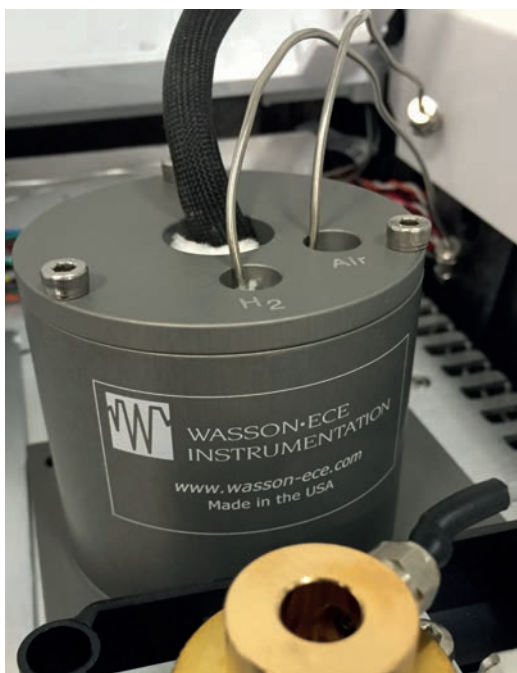
Intuitivní software pro vysoce účinnou automatizovanou přípravu vzorku a následný nástřík vzorku do chromatografu.

Wasson-ECE Reaktor pro úplnou přeměnu organických sloučenin na metan: Příslušenství k FID

Řešení pro komplexní kalibraci

V oboru plynové chromatografie se vždy vyskytoval problém kalibrace. Mnoho běžně používaných detektorů má proměnlivé faktory odezvy pro různé složky. K přesné analýze vzorků musí pracovník nejprve znát příslušný faktor odezvy pro každou sledovanou složku. Tradičním řešením tohoto problému je použití kalibračních standardů, které obsahují všechny sledované složky pro danou analýzu. Tento postup umožní obsluze přístroje stanovit jednotlivé faktory odezvy pro každou složku. Kalibrační standardy obsahující mnoho složek jsou často drahé a podléhají degradaci. Také je zde problém s validací standardů. To se speciálně týká kalibrací se složkami, které mohou reagovat s vnitřními stěnami vzorkovacích lahví nebo mezi sebou. V tomto případě je standard certifikován pro dané koncentrace během přípravy, avšak aktuální dávkované koncentrace mohou být rozdílné od certifikovaného množství. Výsledkem jsou výpočty založené na standardech, které jsou nesprávné.

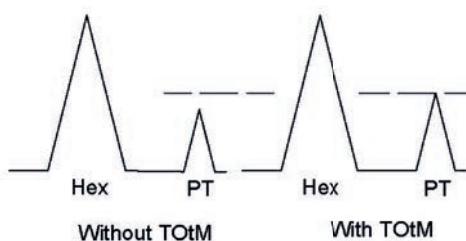
Pokud se zabýváme tímto kalibračním problémem, je jednoduché si představit, jak by vypadalo dokonalé řešení: univerzální detektor s jednotným faktorem odezvy pro všechny složky. Jednotný faktor odezvy by eliminoval potřebu použití složitých a drahých kalibračních standardů a zároveň umožnil analyzovat všechny složky z jednoho kalibračního bodu.



Toto řešení Vám nabídne Wasson-ECE reaktor (TOtM-Total Organics to Methane) pro kompletní přeměnu organických sloučenin na metan. TOtM reaktor je příslušenstvím k FID detektoru a umožňuje využití jednoho univerzálního faktoru odezvy pro všechny uhlíkaté sloučeniny včetně těch, které dříve nebylo možné detekovat FID jako v případě oxidu uhelnatého a oxidu uhličitého bez použití metanizéru. TOtM přemění všechny uhlíkaté sloučeniny na metan katalytickou konverzí. V prvním kroku jsou složky oxidovány na oxid uhličitý a vodu v prostředí přebytku kyslíku. Potom je oxid uhličitý redukován na metan a vodu v prostředí s přebytkem vodíku. Výsledkem je tvorba jedné molekuly metanu na každý uhlík v původní sloučenině. Výhodou této přeměny je, že plocha píku je přímo úměrná obsahu uhlíku v každé složce. To umožňuje, že všechny složky obsahující uhlík v daném vzorku jsou analyzovány s jednotným faktorem odezvy o velikosti 1 za použití vnitřního standardu, tak jak je ukázáno v rovnici uvedené níže.

$$RF_{složka} = 1 = \frac{\text{Plocha píku}_{složka} / \text{Mol } C_{složka}}{\text{Plocha píku}_{ISTD} / \text{Mol } C_{ISTD}}$$

kde $RF_{složka}$ je faktor odezvy (RF-response factor) jakékoliv složky, $\text{Plocha píku}_{složka}$ a $\text{Plocha píku}_{ISTD}$ jsou velikosti ploch píku dané složky a vnitřního standardu (ISTD-internal standard). $\text{Mol } C_{složka}$ a $\text{Mol } C_{ISTD}$ jsou počty molů uhlíku ve složce a vnitřním standardu. Z toho vyplývá, že počet molů uhlíku může být přímo vypočten z velikosti plochy píku s použitím vnitřního standardu. Jakmile je pík identifikován, počet molů uhlíku může být jednoduše přeměněn ke stanovení hmotnosti dané složky.



Obrázek 1

Názorný příklad dvou píků, jeden pro hexan a jeden pro Propylthiol, bez (Without) TOtM a s (With) TOtM. Bez TOtM je pík pro propylthiol (PT) mírně zmenšen vlivem thiolové skupiny v molekule. S použitím TOtM pík PT přesně reflektuje počet uhlíků v molekule, který byl zcela přeměněn na ekvivalentní množství metanu. Z toho vyplývá, že s použitím TOtM je plocha PT píku polovinou plochy hexanu, tj. že oba mají stejný faktor – jejich odezva je úměrná počtu uhlíku v molekule.

Během testování jsme analyzovali čtyři složky při opakovaném dávkování. Těmito čtyřmi složkami byly dva alkany, karbonylová sloučenina (keton) a sirný alkohol (thiol) pro demonstraci schopností reaktoru. Dekan byl použit jako vnitřní standard. Koncentrace jednotlivých složek je uvedena v Tabulce 1. Jako matrice byl použit dodekan. Hmotnosti uhlíků v molekulách byly vztaženy k plochám píků pro vypočtení individuálních faktorů odezvy. Z naměřeného souboru dat jsme zjistili, že průměrný faktor byl $1,00 \pm 0,01$ (Obrázek 2). Pro stejný soubor dat byla stanovena chyba mezi vypočtenou a známou koncentrací ve výši $1,01\% \pm 0,76\%$.

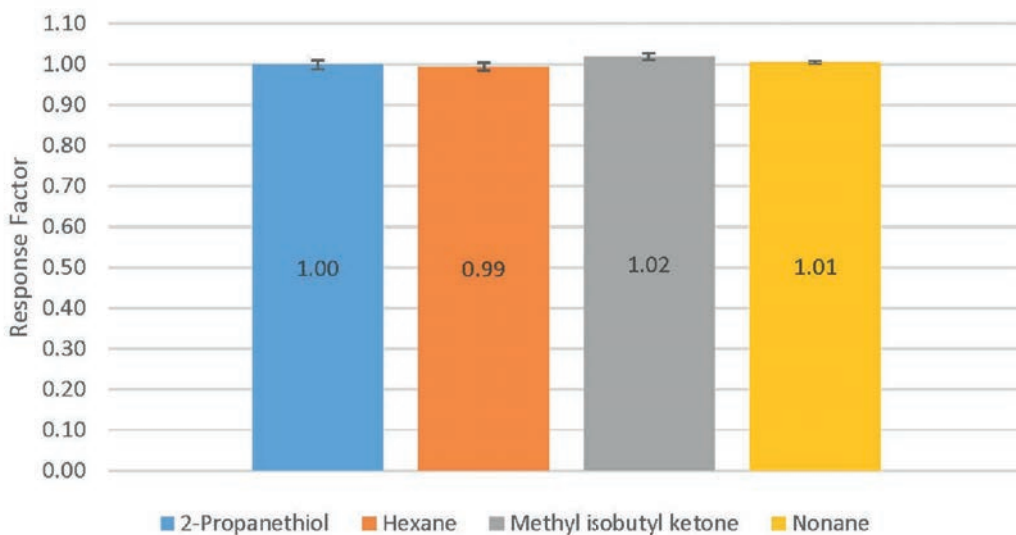
Přeměna všech uhlíkatých sloučenin na metan umožňuje použít jednotný faktor odezvy, kdy koncentrace uhlíku je přímo reprezentová-

na plochou píku. Odtud může být jednoduše vypočtena koncentrace složky jako funkce vlastní koncentrace uhlíku. TOtM je možné jednoduše integrovat do zařízení, které již používají FID pro analýzu a pro jeho použití není nutné se naučit ovládat žádný nový hardware. Použití TOtM reaktoru eliminuje potřebu drahých kalibračních standardů a umožní detekci všech uhlíkatých sloučenin plamenově ionizačním detektorem včetně těch, které nebylo možné dříve s FID stanovit.

Pavel Hrabánek
Wasson-ECE CZ s.r.o.
pavel_hrabanek@wasson-ece.cz

Tabulka 1
Složky a koncentrace

Složka	Koncentrace (Hmot. %)
2-Propanthiol	3,02
Hexan	12,14
Metyl isobutyl keton	5,43
Nonan	12,12
Dekan (ISTD)	10,62



Obrázek 2
Vypočtené faktory odezvy za použití dekanu jako vnitřního standardu

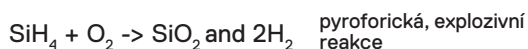
Automatizace panelů pro vzorkování s využitím pro explozivní plyny

38

Analytické techniky jsou často používány na vzorcích v plynné fázi. Plynné vzorky jsou přiváděny do analytických přístrojů použitím vzorkovacích panelů. Panel pro vzorkování dále zpracovává přebytek plynného vzorku a odvádí ho bezpečně k ventilaci. Tyto panely pro plynné vzorky mohou být ovládány ručně nebo jsou automatizovány.

Silan (SiH_4) je velmi důležitá chemikálie, která se používá pro výrobu polovodičů. Silan je nutné analyzovat na různé stopové nečistoty, které by mohly narušit choulostivé vysokofrekvenční vlastnosti tranzistorů ve vyráběných zařízeních a snižovat výtěžnost na desku. Za současných technologií se výroba integrovaných obvodů nebo polovodičů provádí ve formě desek o průměru až 40 palců, kdy cena jedné desky může dosahovat hodnoty 2,5 milionu dolarů v závislosti na typu konstruovaného polovodiče.

Mnoho z analytických metod často používá plynovou chromatografii (GC) s různými detektory včetně hmotnostního spektrometru. Vzorek je přiváděn do GC dávkovacím ventilem pro plyny. Problém nastává, když je chemik požádán o přívod vzorku do dávkovacího ventilu na GC z velkoobjemového zásobníku nebo procesního proudu. Zjevnou výzvou je nutnost vyloučit kontaminaci vzorku okolním vzduchem, který obsahuje mnoho analyzovaných složek. To je pro silan obzvláště důležité, neboť bouřlivě reaguje s kyslíkem za vzniku oxidu křemičitého:



Tato reakce je pyroforická a proběhne samovolně při styku se vzduchem. Navíc velmi bouřlivě, až explozivně, což znamená nebezpečí pro obsluhu a používaný hardware. Vedlejším produktem je SiO_2 , který představuje problém pro citlivé mechanické součástky. Také je uvolňován vodík.

Kvůli těmto důvodům jsou konstruovány integrované panely pro vzorkování a u pyroforických vzorků se používají provedení, která zaručí absolutní těsnost spojů. Takový vzorkovací panel může obsahovat až 20 ventilů a je nutné řešit jejich ovládání. Ventily je možné přepínat ručně, což je v případě silanu nelehký úkol, neboť jediná chyba v sekvenci může vést ke kontaminaci vzorku a explozi.

Z tohoto důvodu používá námi zkonstruovaný vzorkovací panel vzduchem ovládané ventily, které jsou jednotlivě nastavovány použitím Wasson-ECE Automatoru. Automator je společlivý vestavěný systém řízený mikrokontrolérem. Záměrně není vybudován na bázi PC kvůli zamezení možných problémů s PC hardwarem/softwarem, které mohou vést k nespolehlivosti a selhání.

Konkrétněji, Automator je jednoduchý a uživatelem programovatelný stavový automat. Na rozdíl od použití tabulky událostí a reakcí v reálném čase, je stavový automat definován seznamem akcí, kde každá akce je dokončena před provedením akce následující. Samotný přístroj je vybaven 24 digitálními I/O kanály, které mohou být použity k řízení přepínání ventilů, vakuové pumpy, jako například v našem panelu pro vzorkování silanu, či ovládání dalších zařízení. K dispozici je také 16 analogových vstupů. V našem panelu pro silan jsme použili vysoko-vakuový tlakový převodník, abychom mohli měřit vakuum v systému během čistící procedury.

Pro panel byly vytvořeny a naprogramovány metody provádějící různé úkoly. Např. jedním ze zadání bylo propláchnout a evakuovat panel a tím odstranit vzduch ze systému. Další metoda byla naprogramována, aby otevřela lahev silanu, přivedla vzorek k plynovému chromatografu, vedla vzorek přes GC a potom aby došlo k vyrovnání tlaku na jistou pevnou hodnotu s následným spuštěním GC na dálku. Po dokončení analytického měření byla spuštěna další metoda k vypláchnutí přebytku silanu ze vzorkovacího systému do bezpečné ventilace k jeho zneškodnění. Samotný panel se nacházel v prostoru ohraničeném betonovou zdí a nastavení Automatoru proběhlo vzdáleně přes rozhraní LAN.

Výše popsáním způsobem byl Automator použit, aby eliminoval možnost chyby obsluhy přístroje během manuálního provádění přesné sekvence nastavení ventilů, ovládání pumpy a odečtu tlaku. Použitím Automatoru jsme dosáhli exaktního nastavení analytické sekvence v procesu, konzistenci při opakování a vyšší úroveň bezpečnosti pro obsluhu přístroje.

Pavel Hrabánek
Wasson-ECE CZ s.r.o.
pavel_hrabanek@wasson-ece.cz



Obrázek 1
Wasson-ECE Automator



Obrázek 2
Wasson-ECE Automator



Obrázek 3
Automatizovaný, dokonale těsný vzorkovací panel pro bezpečnou analýzu pyroforického silanu.

MĚJTE VELKÉ SNY!

Myslíte, že již není v GC prostor pro velké inovace?

Zkuste se zamyslet znovu...



Obrázek 1
Eliminujte pracné kracování a údržbu kolony



Obrázek 2
Spojení a instalace bez netěsností za méně než 2 minuty



Obrázek 3
Rychlý přístup ke všem informacím



Obrázek 4
Zkrajte čas mezi analýzami na méně než minutu

Od lídra v oblasti plynové chromatografie se očekávají větší věci než jen vylepšování a zdokonalování stávajících technologií, posouvání detekčních limitů nebo řešení standardních výzev a limitací. Očekává se, že bude lídrem také v oblasti vývoje a výzkumu. O zodpovědné plnění těchto očekávání se Agilent Technologies i HPST maximálně snaží, ale je to dost?

Odpověď zní - není. Většina z nás čeká a doufá, že se objeví něco, čím takový lídr změní pohled na stávající svět technologií a přinese uživatelům do té doby nepředstavitelné, unikátní, inovativní a revoluční řešení. Tak jako tomu bylo mnoho let zpátky s příchodem elektronické regulace tlaku (EPC), používání kapilárních kolon nebo konstrukce prvních skutečných QQQ nebo Q-TOF systémů pro oblast plynové chromatografie.

Tentokrát ale Agilent Technologies všechny opět šokoval a přišel s technologiemi, které byly do té doby jen snem a neměly žádné reálné obrysy. Našel tak řešení pro limitace a požadavky většiny z nás, nás uživatelů nebo managerů. Každá z těchto skupin má trochu odlišné požadavky, ale stejné cíle – jednodušší obsluha, snadná i pro méně zkušené uživatele, rychlejší zaškolení, větší robustnost a produktivita. Splnění těchto požadavků bohužel nebylo s využitím aktuálních technologií naplno možné.

Řešením bylo přivést na svět něco naprosto nového, technologicky inovativního, něco, co změní svět plynové chromatografie. Tímto řešením je nový plynový chromatograf Intuvo 9000, který má poprvé v historii plynových chromatografů Agilent Technologies/HP skutečné jméno a ne jenom pouze číselné označení a doplňuje rodinu plynových chromatografů řady 7890, 7820 a 6850.

Nejedná se pouze o samotný hardware plynového chromatografu, ale o kompletní nový svět zahrnující samotný plynový chromatograf a jeho technologie, kompletně nový svět spotřebního materiálu, obsluhy a technické podpory nebo vzdálené správy. To vše pro výrazné zjednodušení práce a údržby, minimalizaci až eliminaci běžných problémů v plynové chromatografii jako jsou netěsnosti nebo potřeba určitých zkušeností pro údržbu nebo výměnu GC kolon a ve výsledku také niž-

ších provozních nákladů a vyšší produktivity.

Přímé vyhřívání, kratší doba analýz – planární konstrukce GC kolon

Proč čekat než se kolona v klasické peci zahřeje nebo zchladí? Tradiční standardní pece u většiny plynových chromatografů nejdříve ohřejí vzduch uvnitř chromatografické pece a potom převedou teplo na GC kolonu. Efektivní... ale ne účinné.

GC Intuvo využívá technologie přímého ohřevu – výrazně rychlejší cesta jak dělat GC analýzy. Planární konstrukce klasických GC kolon umožňuje účinný přímý ohřev, který eliminuje nutnost použití klasických velkých pecí. Nyní můžete Vaše metody zkrátit, použít pouze zlomek energie, produkovat výrazně méně tepla, a to vše na polovině velikosti Vašeho pracovního prostoru.

Rychlá, spolehlivá výměna kolony – „klikni-a-měř“, spojení bez ferulí

Již se nikdy netrapte s utahováním a těsností ferulí - zapomeňte na ně.

GC Intuvo využívá revoluční systém přímého spojení bez nutnosti použití ferulí v celém plynovém chromatografu – přináší tak výrazně jednodušší a spolehlivé zabezpečení integrity celého systému plynového chromatografu a údržbu.

Utažením spojení univerzálním nástrojem a díky slyšitelnému „kliknutí“ s jistotou víte, že Vaše spojení je těsné a to vše v řádu sekund.

Konec zkracování kolony nebo předkolony – technologie ochranného čipu

Jednorázový, rychle a snadno instalovatelný ochranný (guard) čip přináší ochranu chromatografické kolony o délce až 1 m. Je inertnější, přesněji vyrobený, robustnější než klasické předkolony a umožňuje také zpětný proplach pro zvýšení životnosti. Zkracování kolony a posuny retenčních časů jsou již minulostí.

Představte si, že 15metrová kolona bude vždy kolonou 15metrovou!

Lepší inertnost všech cest – vyšší citlivost, lepší přesnost a reprodukovatelnost

Již nikdy nebudete re-analyzovat vzorky.

Inertnost všech míst, se kterými přijde Váš vzorek do styku, je kritickým požadavkem pro přesnou a reprodukovatelnou analýzu stopových koncentrací aktivních analytů

Jednotlivé části nové konstrukce systému Intuvo poskytují díky velice přesné výrobě a kontrole použitých materiálů spolehlivou a stálou inertnost všech částí, které přicházejí do styku se vzorkem.

Snadný přenos a zavedení Vašich stávajících metod

Intuvo kolony, které nevyžadují zkracování, jsou vyráběné ve stejných rozměrech a fázích jako standardní chromatografické kolony Agilent. Jejich planární a kompaktní design tak umožňuje rychle a efektivně zavést Vaše stávající metody na novém stroji.

Tyto kolony a jejich design pracují ruku v ruce s ochrannými čipy, které zabezpečí jejich ochranu a stálé výsledky bez nutnosti zkracování samotné kolony.

A co říkají o novém plynovém chromatografu Agilent Intuvo 9000 zkušení odborníci z praxe?

Video 1: Agilent Intuvo GC System a první názory uživatelů

Zdroj: You tube - „Agilent Intuvo GC System is already making an impact. Customer perspective of Intuvo.“

Link: <https://www.youtube.com/watch?v=J-PW8S7qcMYQ>



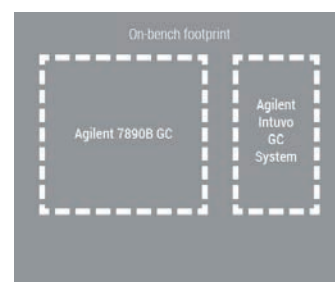
Video 2: Jak důležité jsou v plynové chromatografii inovace. Pohled ze strany uživatelů.
Zdroj: You tube - „Importance of innovation in gas chromatography. Customer perspective of Intuvo“

Link: https://www.youtube.com/watch?v=Hupgh7NkexM&list=PLThrdI2ragonvenY-VHo5_Slww_7daHxaE&index=8



Ivo Novotný
ivo.novotny@hpst.cz

40



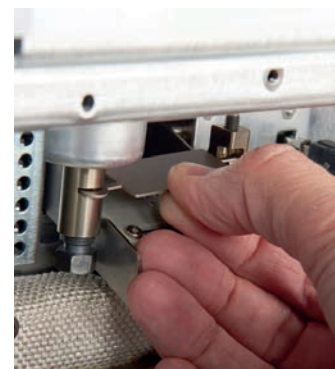
Obrázek 5
Šetřete místo a provozní náklady



Obrázek 6
Možnost klasických nebo MS detektorů



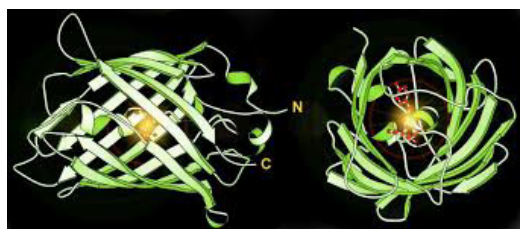
Obrázek 7
Plynový chromatograf Intuvo 9000



Obrázek 8
Ochranný čip Intuvo 9000

Cytosolová exprese Zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a jeho derivátů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*

Od roku 1994 kdy poprvé Chalfie s jeho kolegy provedl izolaci, se stal Zelený fluorescenční protein (GFP) nesmírně populárním a výkonným nástrojem pro neinvazivní sledování buněčných procesů in vivo. GFP je protein složený z 238 aminokyselin, který se izoluje z medúzy *Aequorea victoria*. Protein má elegantní strukturu β -barelu o velikosti 30 x 40 Å, která chrání vnitřní tripeptidový fluorofor (Obrázek 1).



Obrázek 1
Schématické zobrazení zeleného fluorescenčního proteinu. Červeně je zobrazen tripeptidový fluorofor

Po excitaci světlem při 395 nm nebo 475 nm fluorofor GFP emituje jasnou zelenou fluorescenci při 509 nm. Tento jev může být detekován použitím různých instrumentů – jako je fluorescenční mikroskop, fluorescenční průtokový cytometr a fluorimetr.

GFP je vysoce atraktivní nástroj pro dnešní vědce v oborech „life science“, hlavně protože protein nepotřebuje další substráty a kofaktory pro dosažení funkční struktury proteinu. Díky tomu je možná exprese GFP v odlišných živých organismů a buněčných systémů, což má za následek maturaci a fluorescenční signál. Jinými slovy GFP umožňuje buňkám produkovat jejich vlastní fluorescenční marker. Díky tomu je pak možné obejít použití konvenčních fluorescenčních zobrazovacích postupů, při kterých dochází často k toxickému ovlivnění buněk a nelze tak obecně provádět studie in vivo. GFP dovoluje studie buněčných procesů v reálném čase v živých buňkách, intaktních buňkách a organismech, které umožňují lepší porozumění biologickým mechanismům ve fyziologických modelech.

Jedna z prvních aplikací GFP bylo využití GFP jako reportéru genové exprese a proteinové lokalizace. GFP byl použit k vizualizaci buněčných organel, cytoskeletonu a sekreční dráhy. Od té doby se již výrazně rozrostly aplikace GFP a jeho derivátů, které byly vyvinuty.

Mutační studie chromoforů a okolních aminokyselin vyprodukovaly nové deriváty GFP s odlišnými excitačními a emisními spektry. Těmito deriváty jsou modrý (BFP), tyrkysový (CFP) a žlutý (YFP) fluorescenční protein. Všechny tyto barevné proteiny mají vylepšené maturační hodnoty a fluorescenční intenzity. Barevné spektrum bylo nedávno rozšířeno Matzem a jeho spolupracovníky, kteří izolovali červený fluorescenční protein z *Discosoma coral* (dsRed), s 30% sekvenční homologií s Aequorií GFP. Tato široká škála spektrálně odlišných fluorescenčních proteinů poskytuje rozeznatelné markery pro simultánní studie vícenásobných buněčných procesů, stejně jako umožňuje pokročilejší aplikace. Příkladem může být studie interakcí protein-protein s použitím jevu fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET).

Fluorescenční vlastnosti rodiny GFP jsou odlišné v případě spektrálního profilu, intenzity a citlivosti vůči stabilitě signálu. Proto je důležité optimalizovat detekční a měřicí protokoly pro GFP a jeho deriváty ještě před experimentální analýzou v každém experimentálním modelu. Prezentovaná studie má za cíl detekovat a charakterizovat GFP exprimované v cytosolu živých kvasinkových buněk (*Saccharomyces cerevisiae*) s použitím fluorescenčního spektrofotometru **Agilent Cary Eclipse**.

Materiál a metody

Vybavení:

Agilent Cary Eclipse fluorescenční spektrofotometr

Vícekyvetový držák s Peltierovým chlazením a elektromagnetickým mícháním

Teplotní kontrolér

Teplotní sondy

Magnetická míchadélka

Křemenné kyvety

Kmeny kvasinek

YRD15 (*MAT α* , *his3*, *ura3*, *leu2,p+*) kvasinek *S. cerevisiae* byl mateřský kmen použitý v této studii. Geny kódující GFP deriváty (žlutý, zelený, modrý, tyrkysový) a červený fluorescenční protein (DsRED) byly klonovány

do kvasinkového expresního plasmidu pAS1N a transformovány do kvasinkového kmene YRD15, který je popsán výše. Transformované buňky byly nanášeny na kvasinkové minimální médium (0,75% kvasinkové minimální médium bez aminokyselin, 2% glukóza, 1,5% agar) se selektivními markery kultivované 3 až 5 dnů při teplotě 28 °C.

Postup

Kvasinky byly dvakrát promyty v 1 ml MiliQ vody, aby byla odstraněna kontaminující média, poté byly resuspendovány v MiliQ vodě na konečnou optickou hustotu 0,55 Abs při 650 nm. Buněčné suspenze (2ml) byly umístěny do jednorázových fluorescenčních kyvet (Sarstedt) a do vícekyvetového držáku, který byl umístěn do vzorkovacího prostoru Cary Eclipse fluorescenčního spektrofotometru. Teplota v kyvetách byla nastavena na 25 °C. S použitím SW modulu „Scan“ byla buněčná suspenze excitována světlem náležitě vlnové délky pro každý specifický fluorescenční protein (viz webová stránka Clontech – komplexní list excitačních/emisních maxim fluorescenčních proteinů). Emisní skeny byly zaznamenány pro GFP, BFP, CFP, YFP a DsRed. Parametry měření skenů DsRed jsou uvedeny v Obrázku 2.

Výsledky a diskuze

Emisní spektra všech fluorescenčních proteinů jsou znázorněna na Obrázku 3.

Spektra všech fluorescenčních proteinů, jejichž exprese probíhala v cytosolu kvasinkových buněk, byla snadno zaznamenána a spektra korespondují s očekávanými charakteristikami. Šum, produkovaný buněčnou

autofluorescencí, a rozptyl byly zanedbatelné, zejména v důsledku použití vnitřních filtrů, kterými je vybaven jak emisní tak i excitační monochromátor v Agilent Cary Eclipse. Snížení autofluorescence (buď zkoumaného vzorku nebo média) je nesmírně důležité při použití fluorescenčních proteinů, které mají buď nízkou intenzitu fluorescence, nebo jsou excitovány vysoce energetickým UV zářením (jako například BFP). UV záření iniciuje silné fluorescenční odezvy z mnoha složek buněčné prostředí a musí být minimalizovány, aby se zabránilo maskování emise z cílových fluorescenčních proteinů, zejména když se sledují drobné interakce proteinů.

Závěr

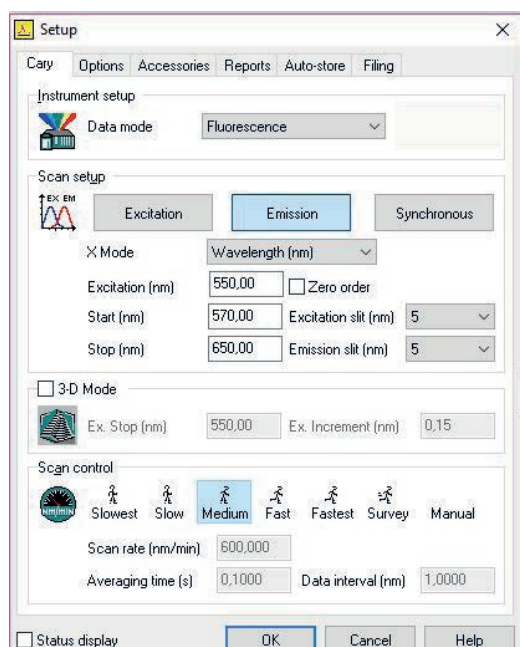
Agilent Cary Eclipse s vícekyvetovým držákem a příslušenstvím pro teplotní kontrolu poskytuje jednoduché, rychlé a reprodukovatelné řešení pro měření a charakterizaci různých fluorescenčních proteinů exprimovaných v celých buňkách. Nyní existuje příležitost specificky označit proteiny zájmu uvnitř buněk pomocí různých GFP a sledovat tak interakce současně pomocí měření při několika vlnových délkách – to umožňuje automatickou excitaci a odečítání emise až pro šest různých fluorescenčních sond in vivo.

Martina Háková

martina.hakova@hpst.cz

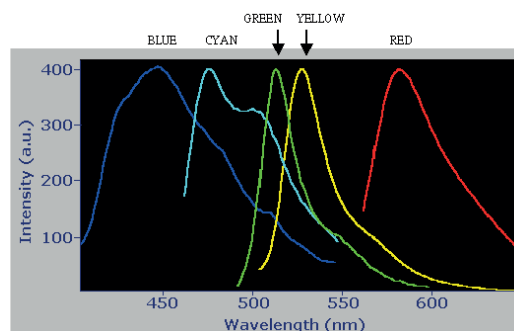
Literatura:

GAVIN, P. et al., Cytosolic expression of Green Fluorescent Protein (GFP) and its derivatives in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Detection in vivo using the Agilent Cary Eclipse. *Agilent Technologies Application Note*. 2011, (SI-A-1831).



Obrázek 2

Instrumentální parametry pro detekci emisního spektra DsRed (emisní maximum 583 nm) a excitace 550 nm (excitace 558 nm)



Obrázek 3

Intenzita vs. emise fluorescenčních proteinů pro celé spektrum

Měření čistoty malých objemů DNA při 4 °C s použitím Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometru s optickým vláknem s mikrosondou



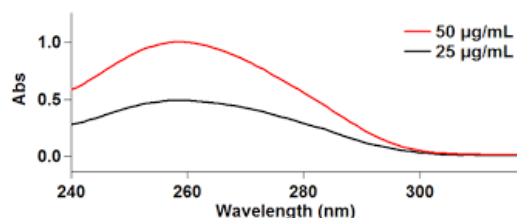
Obrázek 1
Přístroj Cary 60 vybaven optickým vláknem při měření 150 μ l DNA v mikrozkušavce

Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometr je ideálním přístrojem pro měření malých objemů biologických vzorků přímo z jejich skladovacího prostředí – například lednice. Tato studie ukazuje, jak je možné využít Cary 60 pro měření čistoty DNA při 4 °C s použitím příslušenství optického vlákna s mikrosondou. Výsledkem tak jsou značné úspory času i nákladů bez kompromisů v přesnosti a opakovatelnosti kvality dat.

- Už není třeba kyvet
- Měření vzorků přímo z lednice při 4 °C
- Úspora času a peněz za analýzu

Měření čistoty a koncentrace DNA pomocí UV-Vis spektrofotometrie je cenným nástrojem v poli biotechnologie již mnoho let, od doby kdy byla metodika původně vyvinuta Warburgem a Christianem v roce 1942 a později byla optimalizována pro jednoduchá a rychlá laboratorní měření Sambrookem v roce 1989. Klíčové výhody spektrofotometrického přístupu spočívají především v tom, že měření jsou 1) jednoduchá 2) přesná a 3) nedestruktivní vůči vzorku. Je možno tak ušetřit čas, aniž by bylo třeba kompromisu v generované kvalitě dat, stejně tak to přináší finanční výhodu, jelikož není třeba používat velké objemy vzorku nebo další spotřební materiál nutný k měření.

V předkládané studii jsme se zaměřili na nový Cary 60 UV-Vis spektrofotometr s využitím optického vlákna pro měření malých objemů při 4 °C za podmínek normálního laboratorního osvětlení. Tento přístup dovoluje uživatelům dostat přístroj ke vzorkům, a nikoli jako v konvenčním spektroskopickém přístupu kdy vzorek je nutné přinést k přístroji, ve výsledku tak může uživatel provádět jejich analýzu



Obrázek 2
Skeny 150 μ l vzorku DNA při teplotě 4 °C pro dvě koncentrace ukazující charakteristické absorbanční píky při 260 nm

ve zlomku času.

Unikátní optické uspořádání Cary 60 toto umožňuje především díky jedinečné vysoké intenzivní xenonové zábleskové lampě v kombinaci s nejnovější elektronikou. Systém tak umožňuje efektivně zaznamenávat malé změny v absorbanci bez ovlivnění okolním světlem. Hlavní výhody toho přístupu jsou diskutovány dále v tomto článku.

Přístroje a materiály

Cary 60 UV-Vis se softwarem WinUV a PC

Optické vlákno s mikrosondou

„Coupler“ pro optické vlákno

Křemenné kyvety

DNA z telecího brzlíku

Metody a výsledky

Roztoky různé koncentrace DNA (z telecího brzlíku) v rozsahu od 0 do 50 μ g/ml byly připraveny rozpuštěním v MiliQ vodě.

Přístroj Cary 60 byl vybaven „couplerem“ pro optické vlákno s mikrosondou, jak je vidět na Obrázku 1. Jako blankové vzorky byla použita 150 μ l ultra čisté vody v mikrozkušavkách.

Jelikož reagensův molekulární biologii jsou běžně skladovány v lednici, všechny vzorky tedy byly analyzovány ihned po vyjmutí z lednice.

Nejdříve bylo provedeno skenování od 340 do 240 nm s použitím dedikovaného modulu „RNA-DNA estimation“ v rámci softwaru Cary WinUV, aby bylo potvrzeno absorpční maximum komerčního vzorku DNA (Obrázek 2).

Aby byla potvrzena čistota DNA, bylo provedeno měření poměru 260/280 pomocí SW dedikovaného modulu „RNA-DNA estimation“ v softwaru Cary WinUV, který automaticky počítá čistotu vzorku DNA a také odečítá pozadí při 320 nm. Tato aplikace je extrémně jednoduchá na použití, jak dokazuje Obrázek 3, a analýzy byly změřeny za méně než minutu.

Nakonec byla koncentrační křivka vynesena do grafu, aby byla posouzena linearita a reprodukovatelnost měření různých koncentrací vzorků DNA za stejných laboratorních podmínek (Obrázek 4).

Mikrosonda byla vždy mezi měřením jednotlivých vzorků promyta ultračistou vodou.

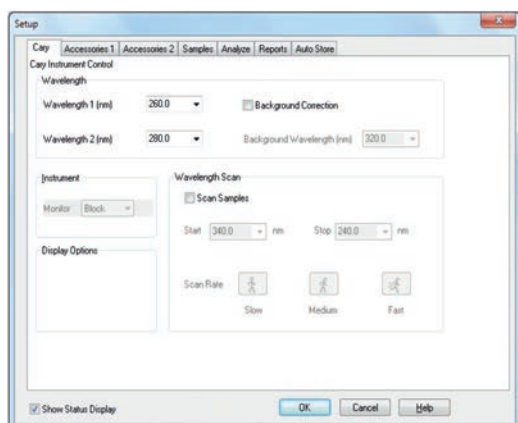
Pro proměření pěti vzorků bylo třeba méně než dvou minut. Při běžné metodě s použitím mikrokyvety, která by vyžadovala čas než by se vzorek ohřál na laboratorní teplotu a čas na čištění kyvety během měření. Celkově vzato, čas analýzy s použitím Cary 60 s optickým vláknem je významně redukován o odhadovaných 80 %. Kromě toho technika optického vlákna není náchylná k potenciální kontaminaci v důsledku manipulace se vzorkem. Přesnost v datech, spolu s výrazným ušetřením času při měření chladných vzorků pomocí mikrosondy ukazuje, že Cary 60 představuje jednoduchý a rychlý a cenově výhodný systém pro měření biologických vzorků, jako je DNA. Tento přístup může být snadno a přímo rozšířen i na další typy vzorků jako je například měření proteinů měření 280 nm.

Závěr

Cary 60 UV-Vis je ideálním přístrojem pro spojení s optickým vláknem, vzhledem k unikátní vysoce intenzivní zábleskové xenonové lampě, která poskytuje vynikající citlivost a opakovatelnost. Rychlost analýz, opakovatelnost výsledků a snadnost použití pro měření vzorků DNA – tyto výhody jsou demonstrovány touto studií.

Dalšími klíčovými výhodami používání Cary 60 s optickým vláknem pro analýzu biologických vzorků jsou:

- Horké i chladné vzorky (4-110 °C) mohou být bez obav analyzovány, naopak při měření v kyvetách mohou tyto podmínky vést k nesprávným a nereprodukovatelným výsledkům.
- Bez limitu na objem vzorku – lze měřit vzorky od objemu 40 µl až do neomezeně většího objemu.



Obrázek 3

Jednoduchý, dedikovaný WinUV automaticky vypočítá čistotu, autenticitu a koncentraci DNA

- Není třeba kupovat drahé křemenné kyvety nebo pak ztrácet čas jejich čištěním
- Pevné látky, práškové nebo gelové formy vzorků je možno změřit pomocí unikátní reflektanční sondy

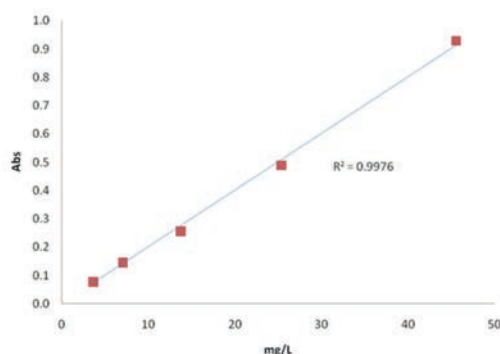
44

Martina Háková

martina.hakova@hpst.cz

Literatura:

FYFE, DJ; COMERFORD, JC: Measuring the purity of low volumes of DNA at 4 °C using the Agilent Cary 60 UV-Vis spectrophotometer with fiber optics microprobe, *Agilent Technologies Application Note*. 2011, (5990-7863EN).



Obrázek 4

Koncentrační křivka DNA vzorků (0 – 50 µl/ml) s použitím 150 µl vzorku při teplotě 4 °C v mikrozkumavkách měřených za podmínek normálního laboratorního osvětlení s pomocí optického vlákna s mikrosondou

Stanovení nanočástic SiO₂ v biologických matricích s využitím Agilent 8900 ICP-QQQ

V posledních letech narůstá využití nejrůznějších nanomateriálů ve velmi širokém spektru aplikací. Nanočástice, tedy částice o velikosti v řádu 1-100nm, nacházejí své uplatnění zejména v lékařství, kosmetice, textilním a potravinářském průmyslu. Nano-měřítka dává částicím, ať už přírodním, a nebo uměle vytvořeným, unikátní fyzikální a chemické vlastnosti. Za zmínku stojí obrovský aktivní povrch vůči celkovému objemu částic, s ním související vysoká reaktivita, velký počet aktivních vazebných míst, na která mohou vázat další látky, tvorba shluků, v jejichž kavitách mohou uzavírat jiné atomy či molekuly a fungovat tím jako biologické přenašeče, a mnoho dalších. Co do velikosti jsou nanočástice řádově menší než jednotlivé buňky. Mohou prostupovat přes biologické membrány a aktivně působit přímo v buněčných organelách například degradovat proteiny (Ag), působit oxidativní stres (Fe, Ag, TiO₂), blokovat buněčné membrány (CuO, SiO₂), katalyticky ovlivňovat biochemické reakce (Fe) a další.

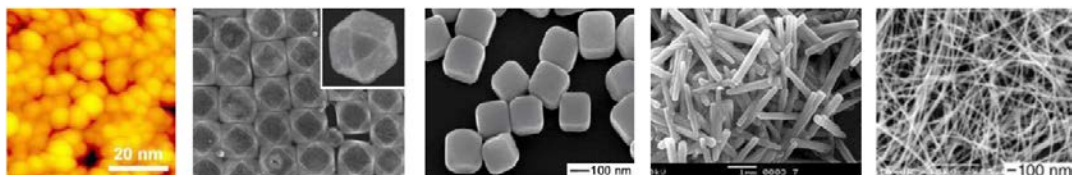
Mezi nejpoužívanější nanočástice patří částice stříbra (výživové doplňky, lékařské pomůcky, hygienické potřeby a textilie s antibakteriální ochranou), oxid titaničitý (bělicí složka kosmetických přípravků, výživové doplňky, katalyzátory se samočisticím povrchem), oxid křemičitý (barvy, potravinové přísady, povrchové úpravy materiálů), oxid zinečnatý (ochrana před UV zářením) nebo zlato (výživové doplňky, kosmetické prostředky, katalyzátory). Odhaduje se, že roční produkce nanočástic se pohybuje v řádu stovek tisíc tun. I přes takto vysokou produkci a širokou škálu uplatnění toho zatím víme jen velmi málo o vlivech nanočástic na organismy, populace, ekosystémy i celé životní prostředí. Samozřejmě již existují studie popisující negativní vliv nanočástic některých prvků na vybrané organismy. Bylo například prokázáno¹, že u ředkviček vystavených působení nanočástic mědi (60-100nm) o koncentraci běžně se vyskytující v odpadních vodách docházelo ke zvýšenému výskytu tvorby lézí, horší odol-

nost vůči plísním a k poškození DNA. Celkové množství mědi absorbované kořeny bylo násobně vyšší v porovnání s paralelními rostlinami vystavenými působení mědi v iontové formě o stejné koncentraci. U pstruhů, jejichž embrya byla vystavena nanočásticím stříbra (<30nm), bylo prokázáno ukládání stříbra v mozku, vývojové deformace a úhyn v raném věku. Dá se předpokládat podobně negativní vliv i u jiných významnějších zemědělských plodin i dalších živočišných druhů, člověka nevyjímaje.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem narůstá zájem vědeckých týmů nejen o fyzikálně-chemické vlastnosti nanočástic a jejich využitelnost v praxi, ale v poslední době také o jejich vliv a dopady na životní prostředí. Hledají se metody, kterými by bylo možné spolehlivě a dostatečně rychle změřit počet nanočástic, a také další veličiny, jako velikost a tvar nanočástic, případně distribuci velikostí, prvkové složení nanočástic, koncentraci prvků v rozpuštěné formě a podíl shluklých částic. Důraz je kladen na jednoduchost, robustnost a přesnost stanovení.

spICP-MS

Řešení všech těchto požadavků na měření nanočástic přináší stanovení na ICP-MS v režimu „Single Particles“ (spICP-MS). Jedná se o jednoduché uspořádání, kdy je homogenizovaný vzorek nanočástic rozptýlených v roztoku přímo nasávan kapilárou do zmlžovače ICP-MS. Výsledkem je časový záznam s pulsy signálu - spiky, které odpovídají jednotlivým nasávaným nanočásticím. Intenzita pulsu = výška spiku je úměrná velikosti nanočástice. Pulsy jednotlivých nanočástic trvají přibližně 200– 500μs, přičemž spolehlivé výsledky je možné vyhodnotit už ze záznamu trvajících méně než 1 minutu. Záznam je možné v software MassHunter s instalovaným modulem pro vyhodnocení nanočástic statistickými operacemi převést na histogramy distribuce intenzit signálu a distribuce velikosti nanočástic.



Obrázek 1
Nanočástice

Z nich se pak dále získají informace o průměrné velikosti částic, koncentraci částic a koncentraci prvku ve formě částic, koncentraci prvku v rozpuštěné iontové formě a minimální měřitelnou velikost částic. Případné shluky či aglomeráty částic se zobrazí jako pulsy s násobnou intenzitou, takže jsou snadno identifikovatelné. ICP-MS je více-prvková metoda a v uspořádání splCP-MS tomu není jinak. Je tedy možné stanovovat směsi nanočástic různých prvků v jednom vzorku, nebo dokonce směsné nanočástice tvořené různými prvky. Pro získání přesných výsledků a dosažení co nejmenšího rozměru měřitelné částice je samozřejmě nutné mít správně připravené vzorky i měřicí podmínky přístroje. Koncentrace částic ve vzorku by neměla být vyšší než řádově 10⁸ částic/litr. Při vyšších koncentracích hrozí, že i v dobře homogenizovaném vzorku budou částice putovat do přístroje příliš rychle za sebou a jinak diskrétní pulsy se budou slévat do shluků. Tím nejkritičtějším místem v technice splCP-MS je bezesporu důkladné ladění na co nejvyšší citlivost sledované hmoty prvku. Na rozdíl od roztokové analýzy, kde intenzita je přímo úměrná koncentraci, částice jsou prostorové útvary, a proto intenzita signálu klesá nebo roste s třetí mocninou rozměru částice. Jinými slovy - kdyby všechny částice měly ideální kulovitý tvar, částice o polovičním průměru by poskytovala 1/8 signálu v porovnání s původní částicí.

Kromě naladění přístroje na maximální citlivost a minimální šum je pro stanovení nanočástic nutné znát také účinnost zmlžování, průměr hadičky peristaltické pumpy a rychlost nasávání vzorku hadičkou. Dále je nutné systém nakalibrovat standardem obsahujícím příslušné nanočástice definovaného rozměru a koncentrace a zároveň obsahujícím prvek v iontové formě také o známé koncentraci. K tomuto

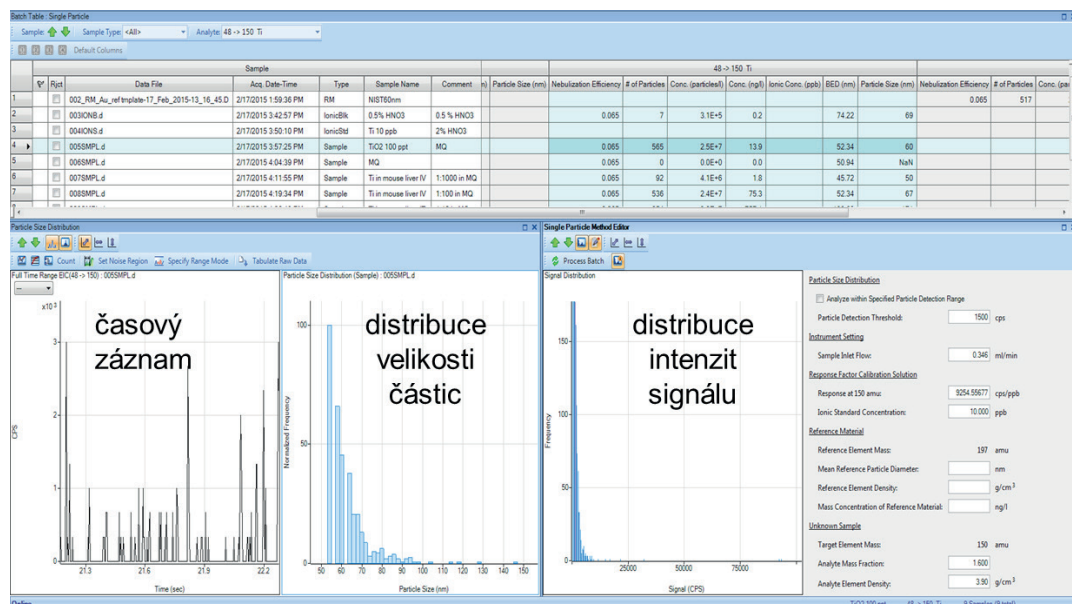
účelu se dají použít již komerčně dostupné standardní roztoky různých nanočástic.

Schopnost spolehlivě změřit nanočástice o co nejmenší velikosti je pochopitelně jedním z hlavních požadavků na metodu. Nezávisí však pouze na maximální citlivosti přístroje, ale také na hodnotě signálu pozadí mezi jednotlivými pulsy. Ten totiž hlavně určuje minimální měřitelnou velikost částice – Background Equivalent Dimension (BED). Signál pozadí je tvořen třemi hlavními složkami:

- koncentrace rozpuštěné formy prvku
- intenzita interferencí
- šum

Je tedy snahou před samotným měřením nastavit takové podmínky, které by všechny tři složky minimalizovaly. Nejjednodušší práce je s koncentrací rozpuštěné formy, kterou můžeme výrazně snížit naředěním vzorku. To se totiž vůbec neprojeví na výsledcích samotných nanočástic. Distribuce velikosti bude i po zředění zachována a koncentrace částic se snadno spočítá podle zředovacího faktoru. Šum se dá minimalizovat správně zvoleným typem zmlžovače a dobře nastavenými podmínkami vstupu vzorku včetně seřazeného nasávání vzorku. Nejsložitější je situace s odstraněním interferencí, jejichž příspěvek k signálu pozadí bývá často tím nejvýraznějším. Matriční interference se dají také minimalizovat naředěním vzorku. Je však řada interferentů, které vznikají přímo z argonu, složek vzduchu nebo vody a takové interference se ředěním odstranit nedají.

Pro dokonalé a snadné odstranění problematických interferencí lze s výhodou využít nejnovější tandemový MS/MS hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem ICP-QQQ 8900 Agilent Technologies, jehož použití si v tomto článku podrobněji ukážeme.



Obrázek 2
Ukázka vyhodnocení záznamu signálu nanočástic v software MassHunter



Obrázek 3
ICP-QQQ 8900

ICP-MS/MS 8900

Jedná se o druhou generaci ICP-QQQ přístroje, která je vylepšena o technologie uvedené a praxí ověřené už u přístroje ICP-MS 7900. Oproti původní verzi 8800 se může nový model 8900 pochlubit zejména delší oktopolovou kolizně-reakční celou umožňující ještě efektivnější odstranění interferencí, off-axis umístěným detektorem minimalizujícím šum, a především novou elektronikou detektoru, která umožňuje nastavit minimální integrační dobu (Dwell time) 100 μ s. Tím v sobě slučuje možnosti nejcitlivějšího ICP-MS systému na trhu s bezkonkurenčním odstupem signálu a šumu, a unikátní technologie odstranění interferencí pomocí kolizní/reakční cely umístěné mezi dva plnohodnotné kvadrupolové hmotnostní filtry, tedy ICP-MS/MS. Stává se tak nejefektivnějším nástrojem pro přesnou detekci nanočástic minimální velikosti.

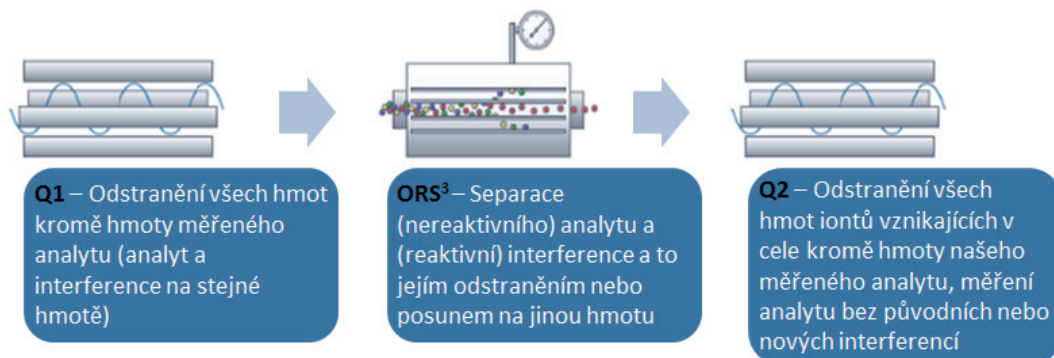
Technologie a princip funkce ICP-MS/MS včetně jednotlivých režimů měření již byly podrobněji popsány v článku vydaném ve třetím čísle tohoto časopisu (Tandemová hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP MS/MS) – analýza bez interferencí).

Jen ve stručnosti - ICP-MS/MS díky své konstrukci umožňuje na prvním kvadrupolu odseparovat hmotu analytu (včetně interferujících látek o stejném poměru hmoty a náboje) od ostatních iontů. V oktopolové cele se kolizním mechanismem či chemickou

reakcí interferent rozbíjí (v případě polyatomických iontů), nebo s využitím rozdílných reakčních entalpií chemických reakcí vytváří z interferentu nebo analytu směsný produkt stejně jako běžné ICP-MS s reakční celou. Analyt na stejné hmotě, nebo na hmotě výsledného produktu pak na druhém kvadrupolu vychází a ostatní hmoty odpovídající interferujícím iontům jsou odfiltrovány. Na rozdíl od běžných ICP-MS s jedním kvadrupolem však do chemické reakce vstupují výhradně předem vybrané ionty o přesném poměru hmoty a náboje, takže výsledné produkty jsou přesně známé a nehrozí riziko vzniku sekundárních interferencí. Na detektor pak z druhého kvadrupolu vycházejí skutečně pouze ionty analytu absolutně oproštěné od interferujících iontů. Viz Obrázek 4.

Uvedení nového modelu 8900 znamená pro instrumentaci ICP-MS/MS kromě jiného důležitý benefit v podobě zkráceného minimálního integračního času z původních 3ms na 100 μ s. Tento zdánlivý detail přináší výrazné zpřesnění právě při měření nanočástic. Jak bylo uvedeno výše, obvyklý signální puls jedné nanočástice trvá 200–500 μ s. S integrační dobou 100 μ s je tak možné oscanovat signální puls 4-7 body a vyhodnotit jeho intenzitu mnohem přesněji jako píků.

U modelu ICP-MS/MS 8800 je minimální integrační doba 3ms a ta umožňuje snímat signály v podobě diskretních „oken“ s délkou 3ms.



Obrázek 4
Základní princip funkce
ICP-MS/MS

Signální pulsy pak ukazují celkovou intenzitu v tomto jednom časovém okně. Může se stát, že do jednoho signálního okna „spadne“ více nanočástic a celkový signál je pak falešně násobně větší. Také se může stát, že signál jedné nanočástice je rozdělen do dvou signálních oken a to pak vede k zobrazení dvou částic s menším rozměrem. Díky statistickému zpracování naměřených dat v software MassHunter jsou tyto mezní případy sice zobrazené, ale pro vyhodnocení mediánu ne až tak podstatné. Klesá tím přesnost stanovení, ne však správnost.

Podle výše uvedeného by se mohlo zdát, že kratší integrační doba vždy vede k přesnějším výsledkům, není tomu tak a tento princip neplatí absolutně. Zkrácením integrační doby se sníží intenzita signálu pulsu. Ta, jak známo, klesá s třetí mocninou velikosti částice. S kratší integrační dobou klesá samozřejmě i signál pozadí, ale ten klesá lineárně (s výjimkou šumu). Zkrácení integrační doby pod 100 μ s již vede k zhoršení odstupů signálu od šumu a k nárůstu BED, neboli minimální detekovatelné velikosti částice. Integrační doba 100 μ s je dobrým kompromisem pro zachování dostatečné intenzity signálních pulsů a zároveň poskytuje dostatečný počet bodů při scanování pulsu jako píku.

Nutno podotknout, že integrační doby v rozmezí 200-1000 μ s jsou pro potřeby stanovení nanočástic nepoužitelné. Pro scanování pulsu jako píky jsou příliš dlouhé a poskytují málo bodů, pro snímání celých částic je signální okno naopak příliš krátké a tak statisticky významné množství signálů částic je rozdělené do více oken, což je příčinou velmi nepřesných výsledků.

Analýza nanočástic SiO₂ na přístroji ICP-QQQ 8900 v režimu „Single Particles“

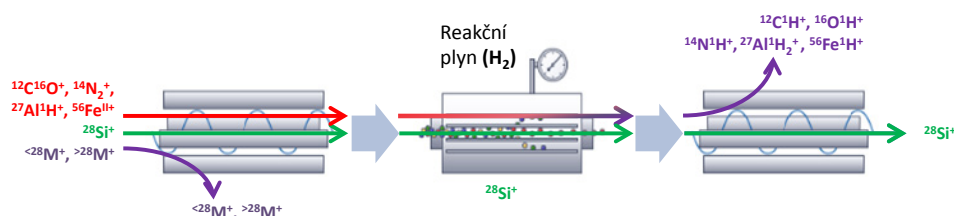
Oxid křemičitý nachází uplatnění v řadě odvětví. Ve formě nanočástic se využívá například jako plnivo do nejrůznějších barev, v potravinářském průmyslu se přidává do většiny instantních potravin jako protispěšková látka a látka bránící vlhnutí, dále jako nosič aroma. Hojně se využívá i jako brusidlo a leštidlo při povrchových úpravách materiálů. Vzhledem k takto širokému použití je potřeba monitorování výskytu nanočástic SiO₂ a jeho vlivu

na životní prostředí na místě.

Křemík se na běžném ICP-MS neměří úplně snadno. Jeho hlavní izotop ²⁸Si (relativní abundance 92.23%) je zatížen několika významnými interferencemi ze vzduchu a matrice, zejména ¹²C¹⁶O⁺ a ¹⁴N₂⁺. Tyto interference pozadí se výrazněji projevují zejména při měření nízkých koncentrací křemíku. Jejich důsledné odstranění je proto kritické pro přesné měření nanočástic a zejména dosažení co nejmenší detekovatelné velikosti částic oxidu křemičitého. Při měření na ICP-MS k odstranění interferencí na ²⁸Si⁺ dobře poslouží vodíkový reakční mód. Absolutní jistotu odstranění všech interferencí a zabránění vzniku sekundárních interferencí, jako například ²⁷Al¹H⁺ poskytuje pouze měření na ICP-MS/MS. V režimu „On-Mass“ je prvním kvadrupolem vybrána hmota 28 (společná pro Si⁺, CO⁺, N₂⁺, AlH⁺, Fe¹¹⁺ a další možné ionty), v reakční cele s použitím vodíku jako reakčního plynu interferenty reagují za vzniku jiných iontů, nebo se rozpadnou na ionty o menší hmotnosti. Na druhém kvadrupolu opět prochází hmota 28 odpovídající už pouze křemíku. Viz Obrázek 5.

Aplikační nota² popisuje stanovení směsi nanočástic SiO₂ různé velikosti v matrici 1% etanolu. Etanol byl použit kvůli obsahu organického uhlíku jako model matrice reálných vzorků biologického původu, farmaceutických substancí či různých organických rozpouštědel, ve kterých se nanočástice SiO₂ stanovují. Měření bylo provedeno na ICP-QQQ 8900 snímáním časového záznamu (TRA) s použitím integračního času 0.1 ms a celkovou dobou analýzy 30s. Signál ²⁸Si byl měřen ve vodíkovém reakčním modu v režimu MS/MS pro efektivní odstranění všech interferencí. Podrobné podmínky nastavení přístroje shrnuje Tabulka 1.

Postupně byly měřeny vzorky obsahující jen demineralizovanou vodu, 1% etanol, a pak nanočástice o velikosti 50nm, 60nm, 100nm a 200nm o koncentraci Si ve formě částic 40ng/l, 40ng/l, 100ng/l respektive 1000ng/l v matrici 1% etanolu. Signál pozadí demineralizované vody a 1% etanolu dosahoval stejné úrovně 2.5 x 10⁴ cps, takže nežádoucí vliv uhlíku byl kompletně odstraněn. Signál nanočástic 60nm a větších byl dobře odlišený od signálu pozadí, u vzorku s obsahem 50nm



Q1 (m/z 28) – odfiltruje všechny ionty kromě m/z 28

Q2 (m/z 28) – odfiltruje všechny ionty kromě m/z 28

Obrázek 5
Měření Si v režimu „On-Mass“

částic již byl odstup signálu od šumu méně zřetelný.

Vyhodnocením výsledků 1% etanolu a vzorku 50nm nanočástic byla zjištěna minimální měřitelná velikost částic (BED) na hodnotě 22nm, což svědčí o výborné citlivosti metody zejména díky perfektnímu odstranění interferencí CO⁺. Signály měření 1% etanolu (A), částic SiO₂ 50nm (B), 60nm (C) a 100nm (D) jsou seřazené v Obrázku 7, u 1% etanolu a 50nm částic navíc ještě doplněné o detail záznamu. Grafy distribuce velikostí částic vzorků 50nm (A), 60nm (B), 100nm (C) a 200nm (D) v 1% etanolu jsou ukázány na Obrázku 6.

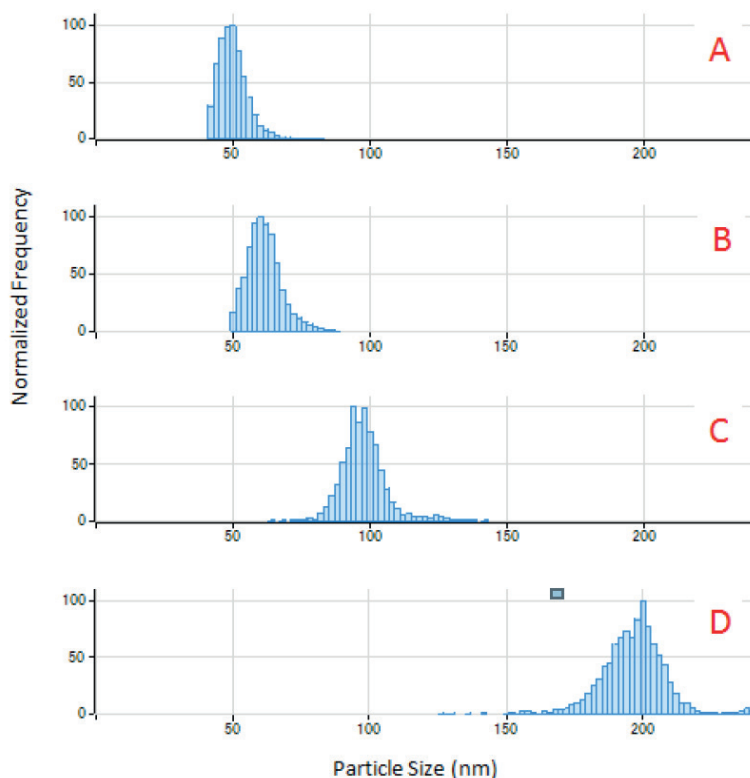
V Tabulce 2 jsou shrnuté výsledky měření vzorků nanočástic v matrici 1% etanolu. Z naměřených dat byly velikosti částic pro srovnání vyhodnoceny jako medián, modus

a aritmetický průměr naměřených hodnot. Ty se perfektně shodují mezi sebou i s referenčním měřením velikostí částic metodou Transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Shoda výsledků je dobrým důkazem toho, že spolehlivé výsledky je možné získat již z 30 sekundové analýzy. Kromě velikostí částic byly u vzorků vyhodnoceny naměřené koncentrace Si ve formě částic v jednotkách ng/l. Jsou rovněž uvedeny v tabulce společně koncentracemi z přípravy vzorků.

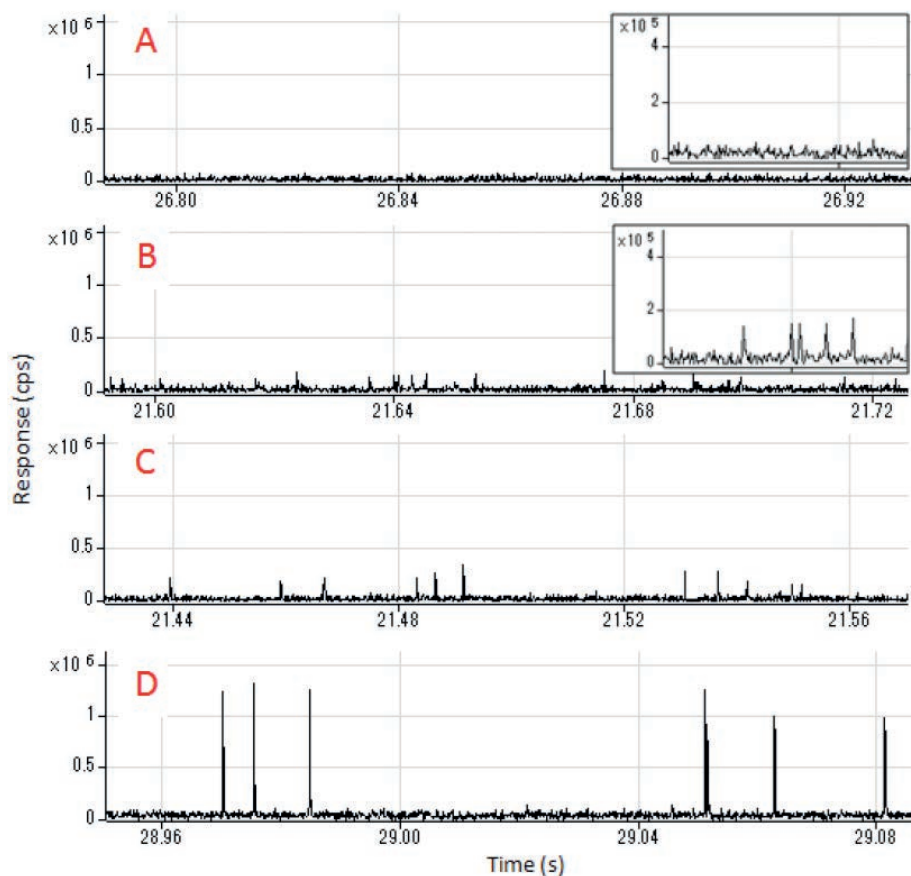
Na závěr byla měřena směs nanočástic 100nm a 200nm v prostředí 1% etanolu. Dle histogramu velikosti částic je patrné dobré rozlišení i dobrá přesnost stanovení velikostí ve směsném vzorku.

Parameter	Value
RF power	1550 W
Sampling depth	7 mm
Carrier gas	0.76 L/min
Sample uptake rate	0.35 mL/min
Spray chamber temp.	2 °C
Dwell time	0.1 ms
Settling time	0 ms
Acquired mass number	28 for Q1 and Q2
Cell gas	Hydrogen
Cell gas flow rate	2.0 mL/min (for water samples) 3.0 mL/min (for 1% ethanol samples)

Tabulka 1
Podmínky měření nanočástic SiO₂
na ICP-QQQ 8900



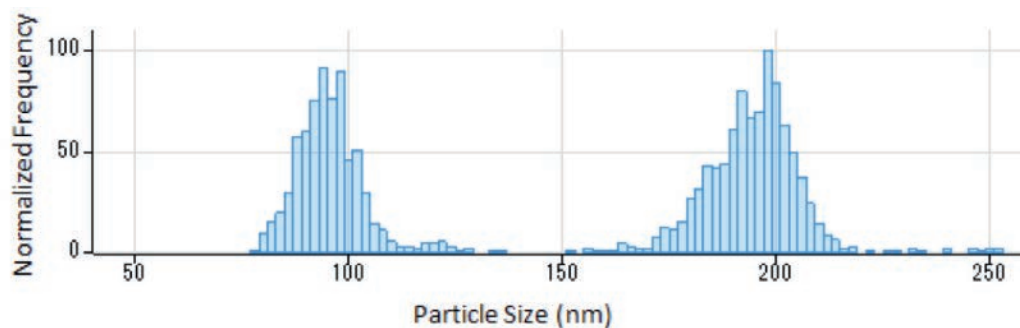
Obrázek 6
Graf distribuce velikosti částic SiO₂
50nm (A), 60nm (B), 100nm (C) a
200nm (D)



Obrázek 7
Signály měření demineralizované vody (A), částic SiO₂ 50nm (B), 60nm (C) a 100nm (D)

Nominal size (nm)	Measured particle size			*Reference particle size obtained by TEM (nm)	Prepared particle concentration (ng/L)	Measured particle concentration (ng/L)
	Median (nm)	Mode (nm)	Mean (nm)			
50	49	50	50	46.3 ± 3.1	40	49
60	61	62	62	57.8 ± 3.5	40	45
100	99	100	102	97.0 ± 4.8	100	92
200	200	204	200	198.5 ± 10.5	1000	956

Tabulka 2
Výsledky měření velikosti a koncentrace nanočástic SiO₂ v 1% roztoku etanolu



Obrázek 8
Graf distribuce velikostí částic ve směsi 100nm a 200nm

Závěr

Je zřejmé, že problematice nanočástic, jejich vlastností a spolehlivému stanovení jejich obsahu v různých součástech životního prostředí bude v dalších letech věnována stále větší pozornost. ICP-QQQ 8900 Agilent Technologies je přesně tím nástrojem, který v sobě sdružuje schopnosti a možnosti potřebné pro měření nanočástic. Jsou to zejména robustnost, rychlost a bezkonkurenční citlivost měření doplněná o unikátní techniku efektivního odstranění maximálního množství interferencí.

Martin Juříček
martin.juricek@hpst.cz

Literatura:

1. KOLE, CH. et al., Plant Nanotechnology Principles and Practices, *Springer International Publishing*, 2016.
2. YAMANAKA, M., ITAGAKI, T., High sensitivity analysis of SiO₂ nanoparticles using the Agilent 8900 ICP-QQQ in MS/MS mode, *Agilent Technologies Application Note*, 2016, (5991-6596EN).

Servisní služby HPST a Zákon o registru smluv

Zákonem o registru smluv 340/2015 Sb. (ZRS) se musí řídit mnoho zákazníků servisního oddělení HPST. Pojďme se tedy podívat, co zákon definuje.

ZRS upravuje podmínky účinnosti smluv, které podléhají platnosti tohoto zákona. ZRS se týká především smluv, jejíž smluvní stranou je právnická osoba, ve které má stát nebo územně samosprávný celek většinou majetkovou účast, a to i prostřednictvím jiné právnické osoby. Neboli, ZRS musí respektovat např. státní nebo národní podniky, veřejné výzkumné instituce nebo veřejné vysoké školy, státní příspěvkové organizace, ústav založený státem nebo územním samosprávným celkem, a jiné, zákonem definované organizace.

Hlavní povinností, kterou zákon ukládá, je uveřejnit smlouvu, která podléhá platnosti ZRS, v registru smluv, který je zřízen jako informační systém veřejné správy a jehož správcem je Ministerstvo vnitra ČR. Způsob uveřejnění smluv je v ZRS taktéž definovaný (§4). ZRS je s výjimkou paragrafů o sankcích platný od 1. července 2016. Paragrafy definující sankce, tj. § 6 a 7, jsou platné od 1. července 2017. Jejich obsahem je úprava platnosti smluv následovně: “Nebyla-li smlouva, která nabývá účinnosti nejdříve dnem uveřejnění, uveřejněna prostřednictvím registru smluv do tří měsíců ode dne, kdy byla uzavřena, platí, že je zrušena od začátku”. Neboli se na tuto smlouvu nahlíží, jako by uzavřena nebyla. Pokud byla na základě smlouvy již servisní činnost započata, smluvní strany jsou povinny podle zásad o bezdůvodném obohacení vydat, co již bylo dodáno. V případě servisních činností je dodávka většinou spojena s prací technika, a tak vrácení případných dílů nekryje veškeré náklady dodavatele. Pro HPST jako dodavatele servisních služeb je tedy důležité před zahájením prací zajistit nebo alespoň ověřit uveřejnění objednávky či smlouvy v registru smluv v zájmu zachování platnosti smlouvy a legalizace poskytnutého plnění.

Vzniklou situaci je možné řešit několika způsoby:

- **Objednávku nebo smlouvu uzavřít v okamžiku potřeby dodávky servisních prací.**

Tento způsob má jednu zásadní nevýhodu: v okamžiku závady za stroji se musí řešit administrativa, která prodlouží dobu, kdy je systém mimo provoz.

- **Uzavření servisní smlouvy.**

V servisní smlouvě lze nadefinovat pravidelné služby (např. pravidelné preventivní údržby) i cenu práce a dopravného po dobu platnosti smlouvy. Cena potřebného materiálu je dána aktuálním ceníkem HPST.

- **Uzavření paušální servisní smlouvy.**

Paušální smlouvy kryjí pravidelné preventivní údržby i provedení oprav vzniklých závad včetně potřebného materiálu. Jedná se vlastně o formu pojištění – ve smlouvě se definuje rozsah krytí a roční fixní cena.

S platností Zákona o registru smluv se uzavření servisní smlouvy stává stále častější variantou, jak administrativně řešit servis používaných přístrojů. Pokud by Vás zajímaly podrobnější informace, kontaktujte servisní oddělení HPST.

Růžena Penížková
ruzena.penizkova@hpst.cz

Kvalitní laboratorní nábytek
od renomovaného výrobce ve všech
cenových úrovních pro Váš pracovní
komfort a bezpečnost.



LABICOM s.r.o. přebírá pro ČR distribuci známých značek chemikálií od společnosti SIGMA-ALDRICH

„Stále pod křídly výrobce Honeywell Research Chemicals“.

Ve společnosti LABICOM s.r.o. stále hledáme nové příležitosti k růstu a rozšíření nabídky pro naše zákazníky. Tak jako v roce 2015 jsme se stali autorizovaným distributorem spotřebního materiálu Agilent Technologies, tak i rok 2016 je pro nás velmi příznivý. Po intenzivních vyjednáváních jsme se v červenci 2016 stali autorizovaným distributorem chemikálií mezinárodní společnosti Honeywell Research Chemicals pro Českou republiku a získanou spoluprací došlo k významnému rozšíření naší nabídky chemických látek o: **Honeywell Fluka™** (Hydranal™), **Honeywell Riedel-de Haën™** (Chromasolv™), a nově **Honeywell Burdick & Jackson™** a **Honeywell**.

Společnost Honeywell aktivně působí na světovém trhu více jak 100 let. Její portfolio zahrnuje řadu produktů od letectví přes klimatizační jednotky až po chemikálie. Divize Honeywell Research Chemicals je světovým lídrem ve vývoji a výrobě vysoce čistých chemikálií splňujících nejvyšší standardy kvality. Díky loňské akvizici části portfolio společnosti Sigma-Aldrich došlo k rozšíření spektra produktů o známé produktové linie např. Chromasolv™ a Hydranal™. Více informací o produktových řadách naleznete v tabulce níže. Všechny zmíněné produkty byly, a nadále budou, vyráběny v továrně Honeywell v německém Seelze. Tedy v oblasti kvality a identity produktu se pro Vás jako našeho

zákazníka nic nemění.

Portfolio Honeywell Research Chemicals zahrnuje:

Honeywell | Burdick & Jackson™

Jedná se o kvalitní a respektovanou značku, která je zaměřená na vysoce čistá rozpouštědla a chemikálie pro biochemické a metabolické syntézy. Součástí portfolio této značky jsou bezvodá rozpouštědla pro syntézy citlivé na vlhkost např. Grignardova nebo Würtzova reakce.

Honeywell | Riedel-de Haën™

V rámci této značky nabízíme chemikálie tradiční produktové řady Chromasolv™, ideální pro kapalinovou a plynovou chromatografii. Dále zde naleznete rozpouštědla pro infračervenou a UV-VIS spektroskopii, rozpouštědla s nízkou koncentrací kovů pro stopové analýzy, rozpouštědla ACS a lékopisné kvality.

Pod značkou Honeywell Riedel-de Haën™ rovněž dodáváme čisté chemikálie do výrobních procesů. Produkty z portfolio Honeywell Fine Chemicals splňují nejpřísnější technologické postupy, požadavky na vysokou kvalitu a čistotu výroby. Uvedené čisté chemikálie je možné také vyrobit i na zakázku.

Honeywell | **Fluka™**

Jedná se o anorganické chemikálie a chemikálie pro anorganickou analýzu jako: kyseliny, soli a pH pufrů a také anorganické sloučeniny s nízkou koncentrací kovů pro stopové analýzy.



Portfolio Honeywell Research Chemicals

Značky	Honeywell Burdick & Jackson™	Honeywell Riedel-de Haën™	Honeywell Fluka™	Honeywell
Portfolio	ROZPOUŠTĚDLA Vysoce čistá rozpouštědla určená zejména pro syntézu	ROZPOUŠTĚDLA Vysoce čistá rozpouštědla	ANALYTICKÁ ČINIDLA Karl Fischer titrace, standardy, kyseliny, zásady, soli a pH pufrů	STANDARDNÍ CHEMIKÁLIE Rozpouštědla a anorganické sloučeniny pro běžné laboratorní použití
Produktové linie	<ul style="list-style-type: none"> • BioSyn rozpouštědla - syntézy DNA, RNA a peptidů • Bezvodá rozpouštědla - syntézy citlivé na vlhkost, organokovové analýzy 	<ul style="list-style-type: none"> • Chromasolv™ - ideální pro chromatografii HPLC, UHPLC, LC-MS, GC, Headspace • Rozpouštědla pro spektroskopii - IR a UV-Vis aplikace • Rozpouštědla ACS a rozpouštědla lékopisné kvality • Rozpouštědla TraceSELECT - rozpouštědla s nízkou koncentrací kovů pro stopové analýzy 	<ul style="list-style-type: none"> • Anorganické chemikálie • Standardní roztoky - tlumivé a koncentrované roztoky • Hydranal™ - stanovení obsahu vody Karl-Fischer titrací • TraceSELECT kvalita - anorganické sloučeniny s nízkou koncentrací kovů pro stopové analýzy 	<ul style="list-style-type: none"> • Rozpouštědla - ACS kvalita pro HPLC, ACS kvalita pro běžné použití, rozpouštědla pro analytické účely, histologii, chemickou syntézu a další průmyslové aplikace • Anorganické chemikálie - pro chemické syntézy, anorganická chemie - včetně základních kyselin, zásad a kovů
Technologie	<ul style="list-style-type: none"> • Program recyklace a možnost opakovaného využití vratných obalů • Omezíte tak uhlíkovou stopu výrobu a ušetříte čas a peníze 	<ul style="list-style-type: none"> • Program recyklace a možnost opakovaného využití vratných obalů • Omezíte tak uhlíkovou stopu výrobu a ušetříte čas a peníze • Honeywell LabReady™ 	<ul style="list-style-type: none"> • Garance kvality - speciální technologie balení hygroskopických anorganických chemikálií 	<ul style="list-style-type: none"> • Možnost dodání ve velkých objemech • Přizpůsobení požadavkům výroby zákazníka

Tabulka 1
Portfolio Honeywell Research Chemicals v nabídce společnosti LABICOM s.r.o.

Značka Honeywell Fluka™ zahrnuje jednu z nejdůležitějších a světově známých produktových řad - řadu Hydranal™ (čidla pro stanovení obsahu vody metodou Karl-Fischer).

Honeywell

Rozpouštědla a anorganické sloučeniny pro běžné laboratorní použití.

Divize Honeywell Research Chemicals také vyvinula speciální technologie pro balení hygroskopických anorganických chemikálií. Zanedlouho bude společnost nabízet taktéž technologii LabReady™, pod kterou se skrývá nabídka výroby přesných komerčních směsí chemikálií pro efektivnější a bezpečnější práci v laboratořích.

Chemikálie od společnosti Honeywell Research Chemicals splňují nejvyšší standardy kvality podle následujících norem: cGMP, TS16949, ISO 9001, 14001, OSHA18001, ISO50001.

Změna jejich distribuce bude provázena výměnou etiket výrobků. Je tedy možné, že se setkáte s produktem, který bude označený starou etiketou Sigma-Aldrich, nebo také již novým označením společnosti Honeywell. Nové etikety budou postupně doplněny o aktuální informace a každý produkt Honeywell Research Chemicals bude označen **datem expirace**, což je velice důležité nejen pro akreditované laboratoře.

Nedílnou součástí při nakládání s nebezpečnými chemikáliemi je dodržování potřebných

bezpečnostních opatření, které jsou uvedeny v bezpečnostních listech. Tyto bezpečnostní listy má společnost LABICOM s.r.o. možnost evidovat a spravovat prostřednictvím speciálního softwaru, který vždy aktualizuje veškeré legislativní změny.

Společnost LABICOM s.r.o. Vám děkuje za Vaši přízeň a těší se na budoucí spolupráci.

Podrobnější informace o společnosti LABICOM s.r.o. a nabízených službách i portfoliu chemikálií Honeywell Research Chemicals naleznete na stránkách www.labicom.cz.

LABICOM s.r.o.
info@labicom.cz



Produktové řady

Honeywell
Honeywell | Burdick & Jackson™
Honeywell | **Fluka**
Honeywell | Riedel-de Haën™

- 1 Webová stránka
Na stránce najdete specifikace produktu, dodatečné informace, dokumentace výrobku: bezpečnostní list (SDS) a Certifikát analýzy
- 2 Katalogové číslo výrobku (před pomlčkou) a číslo šarže
- 3 Datum produkce a **datum expirace** výrobku. Formát data: MM/DD/RRRR
- 4 QR kód, zahrnující katalogové číslo, číslo šarže, datum výroby
- 5 Chemický vzorec látky, molekulová hmotnost, CAS číslo, teplota varu, hustota
- 6 Telefonní číslo pro naléhavé situace
- 7 UN kód, charakteristické čtyřčíslí, které látku nebo směs jednoznačně identifikuje
- 8 Produktová řada Honeywell Fluka, Honeywell Burdick & Jackson, a Honeywell Riedel-de Haën
- 9 Název chemikálie
- 10 Místo výroby
- 11 Produktová linie výrobku, koncentrace, čistota látky
- 12 Výstražné symboly, piktogramy nebezpečnosti
- 13 Velikost balení
- 14 Honeywell Research Chemicals kontaktní údaje
- 15 Signální slova, upozornění na nebezpečí, bezpečnostní upozornění

Obrázek 1
Etiketa výrobku Honeywell

Management



Karel Vranovský
generální ředitel

Tel.: 244 001 231
Mob.: 725 924 019



Naděžda Jeřábková
manažer obchodu
(HPLC, CE, disoluce)
Tel.: 244 001 242
Mob.: 724 252 914



Alexandr Skála
manažer servisu
(servis GC/MS, LC/MS)
Tel.: 244 001 243
Mob.: 724 803 434



Olga Schlossbauerová
finanční ředitel

Tel.: 244 001 241
Mob.: 702 281 172



Zbyněk Halbhuber
manažer pro skupinu
genomiky a diagnostiky
Tel.: 244 001 245
Mob.: 607 081 918



Daniela Tršová
manažer marketingu

Tel.: 244 001 232
Mob.: 602 158 401

Obchodní tým



Jan Kovář
produktový specialista
(HPLC, CE, disoluce)
Tel.: 244 001 231
Mob.: 607 081 917



Jitka Zrostlíková
produktový specialista
(LC/MS)
Tel.: 244 001 249
Mob.: 606 047 034



Ivo Novotný
produktový specialista
(GC/MS, ICP-MS)
Tel.: 244 001 240
Mob.: 724 309 027



Jan Marek
produktový specialista
(GC, MP-AES, ICP-OES, AAS)
Tel.: 244 001 231
Mob.: 606 050 908



Martina Háková
produktový specialista
(FTIR, UV-Vis-NIR, fluorescence)
Tel.: 244 001 239
Mob.: 730 572 998



Michaela Pluskalová
odborný asistent týmu
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 736 606 878



Iva Šenitková
produktový specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 702 281 171



Aleš Merta
produktový specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 731 538 641



Michal Jež
produktový specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 731 643 168



Michaela Vránová
marketingový specialista
Tel.: 244 001 232
Mob.: 731 157 661



Andrea Barešová
obchodní asistent
Tel.: 244 001 239
Mob.: 732 963 045



Anastassiya Zidkova
bioinformatik
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 739 030 865

Aplikační tým



Ondřej Lacina
aplikační specialista
(LC/MS)
Tel.: 244 001 249
Mob.: 602 600 235



Michal Čaplygin
aplikační specialista
(GC/MS)
Tel.: 244 001 248
Mob.: 725 433 353



Tomáš Antl
aplikační specialista
(genomika a diagnostika)
Tel.: 244 001 245
Mob.: 735 192 823

Administrativní tým



Ludmila Freyová
logistika, objednávky
spotřebního materiálu
Tel.: 244 001 236
Mob.: 724 105 611



Lucie Bahníková
obchodní referentka
Tel.: 244 001 234
Mob.: 735 192 822



Kateřina Doušová
asistentka
Tel.: 244 001 231
Mob.: 724 804 643

Servisní tým



Dagmar Lehká
servisní koordinátor
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 004 993



Michaela Průchová
servisní koordinátor
Tel.: 244 001 247
Mob.: 727 812 449



Vladimír Navara
servis GC, GC/MS,
headspace, desorpce
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 805 769



Zbyněk Boháček
aplikační podpora,
servis GC, GC/MS, LC
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 805 278



Milan Souček
servis GC, GC/MS
Tel.: 244 001 237
Mob.: 602 651 576



Hana Lišková
servis GC, GC/MS
Tel.: 244 001 237
Mob.: 602 319 689



Jan Adamiec
servis LC, LC/MS, CE,
UV-Vis, FTIR
Tel.: 244 001 247
Mob.: 602 261 365



Petr Dušek
servis LC/MS, GC,
GC/MS
Tel.: 244 001 237
Mob.: 724 807 189



Radek Koláčny
servis LC, CE, UV-Vis,
disoluce
Tel.: 244 001 247
Mob.: 724 891 356



Rostislav Pantůček
servis LC, automatizace
Tel.: 244 001 247
Mob.: 725 341 292



Tomáš Fojtik
servis AAS, ICP-OES
ICP-MS
Tel.: 244 001 237
Mob.: 702 287 862



Martin Juříček
servis AAS, ICP-MS,
ICP-OES, MP-AES
Tel.: 244 001 247
Mob.: 724 703 774



Vít Peterka
servis přístrojů pro
genomiku
Tel.: 244 001 247
Mob.: 605 205 892



Růžena Penížková
servisní smlouvy, servis
přístrojů pro genomiku
Tel.: 244 001 230
Mob.: 724 305 436



Michal Novotný
softwarový specialista
Tel.: 244 001 244
Mob.: 724 309 037



Laboratorní příslušenství a přístroje

LABICOM s.r.o.
VTP UP
Šlechtitelů 19
783 71 Olomouc

Objednávky: objednavky@labicom.cz
Informace: info@labicom.cz
Servis: servis@labicom.cz
Fakturace, Logistika: provoz@labicom.cz
www.labicom.cz

Ing. Robert Kukula
E-mail: robert.kukula@labicom.cz
Tel.: +420 724 807 092

Ing. Jaroslav Andrlé, Ph.D.
E-mail: jaroslav.andrle@labicom.cz
Tel.: +420 731 155 148



Mgr. Iva Chvilíčková, Ph.D.
E-mail: iva.chvilickova@labicom.cz
Tel.: +420 731 479 740

Ing. Jitka Berková
E-mail: jitka.berkova@labicom.cz
Tel.: +420 602 777 356

Mgr. Jana Havelková
E-mail: jana.havelkova@labicom.cz
Tel.: +420 607 006 300

- Praha 2, 3, 9 > Ing. Robert Kukula
- Praha 4, 5, 6 > Ing. Jitka Berková
- Praha 1, 7, 8, 10 > Ing. Jaroslav Andrlé, Ph.D.





Labicom

Autorizovaný distributor
pro Českou republiku

Honeywell

Research Chemicals



Nabízíme portfolio chemikálií tradičních značek:

Honeywell
Fluka[™]

Analytická činidla, standardy,
kyseliny, zásady, soli a pH pufrů.

Honeywell
HYDRANAL[™]

Světový lídr ve výrobě chemikálií
pro Karl-Fischer titrace.

Honeywell
Riedel-de Haën[™]

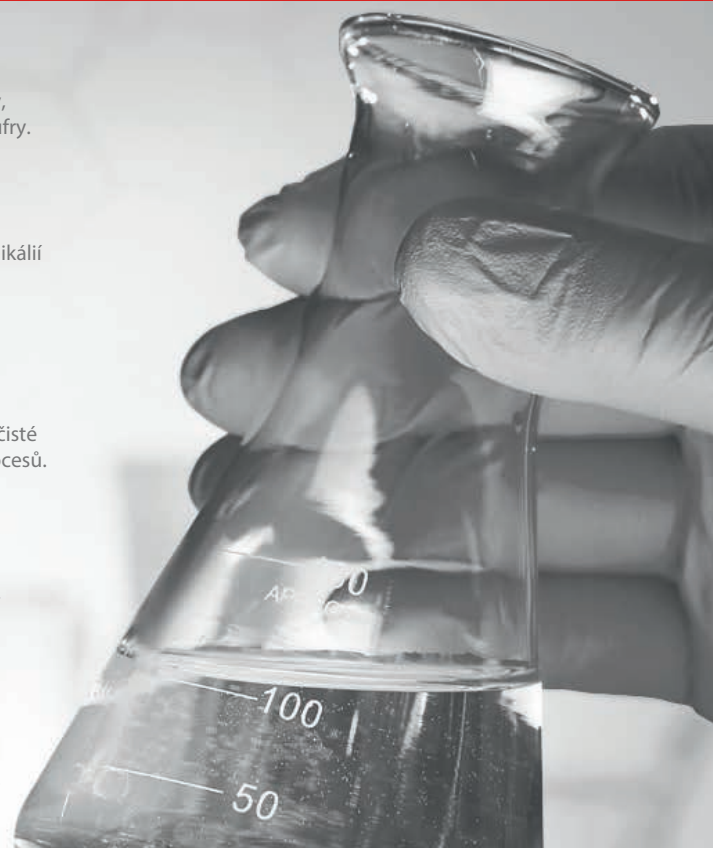
Vysoce čistá rozpouštědla a čisté
chemikálie do výrobních procesů.

Honeywell
CHROMASOLV[™]

Vysoce čistá rozpouštědla
zejména pro chromatografii.

Honeywell
Burdick & Jackson[™]

Vysoce čistá rozpouštědla
určená zejména pro syntézu.



Nejnovější aplikační literatura

Biologie a medicína

5991-7023EN	Innovator and Biosimilar Monoclonal Antibody-Peptide Map Comparison
5991-7024EN	Analysis of N-Linked Glycans from Antibody-Drug Conjugate (ADC)
5991-7026EN	Conformational Studies Using Second Derivative Absorption Spectroscopy for Comparing an Innovator and Biosimilar Monoclonal Antibody Pair
5991-7192EN	Determination of Drug to Antibody Distribution in Cysteine-Linked ADCs
5991-7223EN	Protein A Affinity IgG Capture Followed by AdvanceBio SEC Aggregation Analysis
5991-7297EN	Clone Selection Using the Agilent 1290 Infinity Online 2D-LC/MS Solution
5991-7442EN	Method Transfer from a 1260 Infinity Bio-inert LC to a 1260 Infinity II Bio-inert LC - Charge Variant Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar
5991-7476EN	A Comprehensive Workflow to Optimize and Execute Protein Aggregate Studies
5991-7553EN	Size Exclusion Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Antibody Drug Conjugates
5991-7615EN	Use of the Agilent 4200 TapeStation System for Sample Quality Control in the Whole Exome Sequencing workflow at the German Cancer Research Center (DKFZ)

Farmacie a biofarmacie

5991-7095EN	Method Transfer from an Agilent 1200 Series LC to an Agilent 1260 Infinity II LC
5991-7320EN	Application of an Accurate Mass Database and Library
5991-7366EN	An Integrated Workflow for Automated Calculation of Antibody-Drug Conjugate (ADC) Drug-to-Antibody Ratio (DAR)
5991-7505EN	Quality-by-Design-Based Method Development Using an Agilent 1290 Infinity II LC
5991-7514EN	Method Transfer from an Agilent 1260 Infinity LC to an Agilent 1260 Infinity II LC
5991-7518EN	Improved Aromatic Acids Analysis
5991-7642EN	Method Transfer from an Agilent 1100 Series LC to an Agilent 1260 Infinity II LC

Genomika a buněčná analýza

5991-7013EN	Setting up a cell-free DNA analysis pipeline with OneSight. Step-by-step approach
5991-7123EN	Assessing functional metabolism using cells sourced from blood
5991-7124EN	Assessing mitochondrial dysfunction in primary cardiomyocytes
5991-7125EN	Assessing the impact of autophagy on cellular metabolism
5991-7127EN	Bioenergetic analysis of primary neuronal deficiencies
5991-7128EN	Bioenergetic analysis of suspension cells: hematopoietic stem cells and lymphocytes
5991-7129EN	Determining Metabolic Switch in Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)
5991-7131EN	Functional validation of Genomic and Proteomic data
5991-7132EN	Measuring bioenergetic profiles of human adipocytes
5991-7133EN	Measuring functional metabolism of brite adipocytes
5991-7134EN	Measuring glycolysis and oxidative metabolism in cancer cells
5991-7135EN	Measuring glycolytic function in cells
5991-7138EN	Metabolic Pathway Determination Using the XF24 Analyzer
5991-7139EN	Normalizing XF metabolic data to cellular or mitochondrial parameters
5991-7140EN	Screening for Mitochondrial Biogenesis and Toxicity
5991-7142EN	Direct Comparison of Radiometric versus XF24 Flux Assays to Measure Substrate Utilization
5991-7557EN	Agilent Integrated Solutions for Design, Synthesis and Quality Control of Guide RNA for CRISPR-Cas9 Genome Editing Workflows.

Metabolomika a proteomika

5991-1461EN	Simultaneous quantitation of peptides and phosphopeptides by capLC-ICP-MS using the Agilent 8800/8900 Triple Quadrupole ICP-MS
5991-3207EN	Affinity Removal of the 14 Most Abundant Proteins in Human Plasma Using the Agilent 1260 Infinity Bio-inert Quaternary LC System
5991-6449EN	Investigating Antibiotic Mode of Action Using Targeted Metabolomics
5991-6518EN	Using GCxGC and the Agilent 7200 GC/Q-TOF for an Untargeted Metabolomics Study
5991-6810EN	Qualitative Flux Analysis of a Chondrosarcoma Cell Line Using Agilent VistaFlux

Forenzní analýza a toxikologie

5991-6771EN	Removal of Lipids for the Analysis of Toxicological Compounds in Plasma by LC/MS/MS
5991-6964EN	THC-COOH Determination in Hair with LC/MS/MS: A Challenging Request
5991-7019EN	Determination of amphetamine and derivatives in urine
5991-7506EN	Determination of 3,4-MDMA in Ecstasy tablets by CE-MS/MS

Klinický výzkum

5990-9128EN	Development of an LC/MS/MS Assay for Atorvastatin in Human Plasma Using a 6460 Triple Quadrupole LC/MS System
5990-9132EN	A Q-TOF Generated, Metabolomics- Specific LC/MS/MS Library Facilitates Identification of Metabolites in Malaria Infected Erythrocytes
5990-9233EN	Development of an LC/MS/MS Method for Bupropion in Human Plasma Using a 6460 Triple Quadrupole LC/MS System

Potraviny a zemědělství

5991-7030EN	Determination of Relative Fluorescence Quantum Yield Using the Agilent Cary Eclipse
5991-7064EN	Rapid Profiling of VOCs and SVOCs in e-Cigarette Vapors for Regulatory Compliance and Quality Control
5991-7302EN	Accurately Identify and Quantify One Hundred Pesticides in a Single GC Run
5991-7342EN	Agilent JetClean Self-Cleaning Ion Source for Pesticides in Food and Feed
5991-7381EN	Determination of Mycotoxins in Peanuts with Enhanced Matrix Removal-Lipid by LC/MS/MS
5991-7423EN	Determination of Malic Acid and Lactic Acid in Wine by CE-MS/MS
5991-7552EN	High-Resolution Analysis of Mangosteen Pericarp Xanthones Using 2D-LC

Životní prostředí

5991-7046EN	Elemental analysis of drinking water using the PerkinElmer AAnalyst 800 AAS
5991-7071EN	Determination of Iodinated Contrast Media in by Direct-Injection LC/MS/MS
5991-7259EN	Direct Analysis of Contaminants in Surface Waters Agilent 6470A Triple Quad LC/MS
5991-7303EN	An Optimal Method for the Analysis of Pesticides in a Variety of Matrices

Materiálová analýza

5991-7039EN	Characterization of Polyesters by Agilent 1260 Infinity Multi-Detector GPC/SEC System
5991-7200EN	Analysis of Extractable and Leachable Metals in Plastic Materials of Construction as per <661.1> Acid Extractable Procedure using the Agilent 5110 VDV ICP-OES
5991-7283EN	Direct determination of Al, B, Co, Cr, Mo, Ti, V and Zr in HF acid-digested nickel alloy using the Agilent 4210 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer
5991-7530EN	Automated Spectrophotometric Spatial Profiling of Coated Optical Wafers

Geochemie, hornictví, kovy a polovodiče

5991-7008EN	Determination of trace elements in ultrapure semiconductor grade sulfuric acid using the Agilent 8900 ICP-QQQ in MS/MS mode
5991-7103EN	Rapid determination of gold in geological samples using the Agilent 4210 MP-AES
5991-7136EN	Measuring the Metabolic Switch in Cancer Cells
5991-7285EN	Sulfur isotope fractionation analysis in mineral waters using an Agilent 8900 ICP-QQQ

Energetika, chemie, speciální chemikálie

5991-6849EN	Improved productivity for the determination of metals in oil samples using the Agilent 5110 Radial View (RV) ICP-OES with Advanced Valve System
5991-6905EN	Accurate analysis of neptunium 237 in a uranium matrix, using the exceptional abundance sensitivity in MS/MS on the Agilent 8800 ICP-QQQ
5991-7104EN	Direct multi-elemental analysis of crude oils using the Agilent 4200/4210 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer
5991-7271EN	Determination of Olefin Content in Denatured Ethanol According to ASTM D7347

Tyto publikace jsou ke stažení na našich stránkách www.hpst.cz, nebo nám o ně můžete napsat spolu s uvedením příslušného čísla publikace na email marketing@hpst.cz.

HPST, s.r.o.

Písnická 372/20

142 00 Praha 4

Česká republika

Tel.: +420 244 001 231

Fax: +420 244 001 235

E-mail: info@hpst.cz

Web: www.hpst.cz



hpst