

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2013/210



ZAKLJUČNO POROČILO RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	Z4-3679
Naslov projekta	Implementacija ionske kromatografije-tandemske masne spektrometrije v analitiki kratkoverižnih RNK molekul: razvoj metodologije in analiznih protokolov
Vodja projekta	24445 Mitja Križman
Tip projekta	Zt Podoktorski projekt - temeljni
Obseg raziskovalnih ur	3400
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	05.2010 - 04.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.07 Tehnologija živil rastlinskega izvora
Družbeno-ekonomski cilj	13.04 Kmetijske vede - RiR financiran iz drugih virov (ne iz SUF)

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	4.04
- Veda	4 Kmetijske vede
- Področje	4.04 Kmetijska biotehnologija

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Podoktorski projekt Z4-3679 je bil usmerjen v razvoj analiznih metodologij za določanje kratkoverižnih molekul RNK. V okviru

projekta je bila glavna dela namenjena izboljšavam in razvoju novih pristopov h kromatografski separaciji in masno-spektrometrični (MS) detekciji molekul RNK. Razvita je bila kromatografska separacija, ki temelji na kombinaciji ionske izmenjave in hidrofilnih interakcijah analitov s stacionarno fazo, ob uporabi hlapnih eluentov, kompatibilnih z MS detekcijo. S tem se je bilo mogoče izogniti razsoljevanju mobilne faze, ustaljeni praksi v ionski kromatografiji in posledično poenostaviti analizni postopek. Ugotovljeno je bilo, da je višja občutljivost MS detekcije RNK mogoča ob uporabi dvostopenjske fragmentacije analita, tako v ionskem izvoru kot v trkovni celici. Poleg primarnega raziskovalnega cilja so bile izvedene analize RNK iz različnih vzorcev, zlasti rastlinskih in glivnih. V sklopu projekta smo prišli tudi do idejne zasnove novega tipa razsoljevalnika mobilne faze, uporabnega v primeru uporabe nehlapnih eluentov (soli). Vzpostavljeno je bilo tudi sodelovanje z raziskovalno skupino LADETEC in prof.dr.Franciscom Radlerjem iz Univerze v Rio de Janeiru (UFRJ, Brazilija), na področju plinsko kromatografske analize nukleotidne sestave nukleinskih kislin ter razvit nov enostaven postopek za pripravo (derivatizacijo) nukleinskih kislin za analizo sestave le-teh s plinsko kromatografijo.

ANG

The post-doctoral project Z4-3679 was focused into the development of analytical methodologies for determination of short-chained RNA. Within the project, the majority of the work has been done on improvements and development of new approaches for chromatographic separation and mass-spectrometric (MS) detection of RNA. An MS-compatible chromatographic separation, based on the combination of ion-exchange and hydrophylic interactions, has been developed, using volatile eluents. With such approach, it was possible to avoid the mobile phase desalting step, a common practice in ion chromatography, and thus simplifying the analytical procedure. It was found that higher MS detection sensitivity for RNA can be achieved by a two-step fragmentation of the analyte, both in the ion source and in the collision cell. Besides the primary research goal, RNA analyses of different samples have been performed, especially on plant and fungal samples. During the project we have also come to the idea of a new type of mobile phase desalter useful for non-volatile eluents (salts). We also established a collaboration with the LADETEC research group and prof.dr.Francisco Radler from the University of Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil) in the field of gas-chromatography and a new analytical procedure for determination of nucleotide composition of nucleic acids has been developed.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Namen

Kratkoverižne RNK molekule so v zadnjih letih čedalje pomembnejši objekt znanstvenih raziskav, zaradi ugotovljenega njihovega ključnega pomena pri regulaciji celičnih mehanizmov. Kljub temu, da število odkritih tovrstnih RNK molekul nezadržno narašča, obstajajo še vedno velike omejitve z vidika raziskovalne metodologije. Razlog za slednje je v prvi vrsti zelo specifična narava teh molekul-amfoternost, njihova sekundarna/terciarna struktura itd. Uporaba separacijskih tehnik v primerjavi z uveljavljenimi tehnikami molekularne biologije zato predstavlja zanimivo alternativo pri raziskavah teh molekul, še posebej pri presejalnih analizah vzorcev. Podoktorski projekt Z4-3679 je bil zaradi navedenih razlogov usmerjen v izboljšave obstoječih in razvoj novih separacijskih in detekcijskih postopkov kratkoverižnih RNK molekul z namenom pridobitve novih postopkov in znanj s področja analitike RNK.

Kromatografska separacija

Najpomembnejši del celotnega projekta je bil seveda razvoj primerne postopka kromatografske separacije za analizo molekul RNK dolžine do 30-35 nukleotidov (najpogostejša dolžina teh molekul je 21-22 nukleotidov). Sprva je bilo predpostavljeno, da bo možen uspešen razvoj separacije (predvsem z vidika masno-spektrometrične detekcije) na že uveljavljenih stacionarnih fazah za ionsko-izmenjevalno kromatografijo (kvarterno-aminske faze), ob uporabi nehlapnih eluentov ter posledično tudi uporabo uveljavljene tehnologije razsoljevanja ionsko-izmenjevalne mobilne faze (supresorjev). Žal pa se je izkazalo, da slednje ni mogoče, vsaj ne ob obstoječi tehnologiji (komercialno dostopnih) razsoljevalnikov-supresorjev (kljub zagotovitvi proizvajalcev, da to je), ker slednji uporabljajo kombinacijo tako kationskih kot anionskih membran. Posledično prihaja do akumulacije analitov (RNK) na eni od membran, kar seveda popolnoma onemogoči detekcijo.

Ugotovljena in delno preskušena je bila tudi idejna zasnova primerne tipa supresorja za razsoljevanje eluentov sestavljenih iz NaCl ali KCl, vendar do končne aplikacije v praksi do le-tega ni prišlo zaradi pomanjkanja časa in zlasti finančnih sredstev v okviru projekta (kar tudi sicer ni bil eden od ciljev projekta). Vedno pa obstaja možnost, da se delo v tem segmentu nadaljuje, v kolikor bodo okoliščine to dovoljevale, ter razvije funkcionalni prototip izdelka, z velikimi možnostmi za komercializacijo.

Iz navedenih razlogov so dosedanje objave s področja IC-MS analitike RNK temeljile na predhodni razsolvitvi ločenih analitov ter off-line injiciranja (razsoljenih raztopin) le-teh v masni spektrometer. Zaradi navedenih razlogov smo se odločili za testiranje alternativnih stacionarnih faz s šibkimi (an)ionskimi izmenjevalci, katere obenem delujejo tudi preko drugih kromatografskih interakcij (hidrofilnih, pi-pi, itd.). Pomemben vidik vseh kromatografskih kolon oz. stacionarnih faz je ta, da je eluiranje analitov, tudi polianionskih (kakršna je RNK) možno tudi z mobilno fazo nizke ionske jakosti ter hlapnim pufrom. Slednje omogoča direktno sklopitev kromatografske separacije z masnim spektrometrom, brez razsoljevanja.

S tem namenom so bile preizkušene kromatografske kolone na osnovi polietilenimina, aminopropil-silike, grafitiziranega ogljika in karbamoil-silike (amida). Kot najprimernejša stacionarna faza, za omenjeni velikostni rang RNK, se je izkazala faza z amidnimi skupinami (karbamoil-silika), na kateri je bila opravljena velika večina dela na projektu. Slednja je omogočila uporabo hlapne mobilne faze na osnovi vode/acetonnitrila in z nizkimi koncentracijami amonijevega acetata/formiata kot ionskega eluenta. Slabost te stacionarne faze je dolžina potrebnega časa za ponovno vzpostavitev začetnih kromatografskih pogojev (ker je separacija možna le z uporabo gradienta mobilne faze). Ugotovljeno je bilo, da že manjše koncentracije metanola v mobilni fazi (1-2 vol. %) bistveno skrajšajo potreben čas ponovne vzpostavitve začetnih pogojev separacije (za faktor 2 do 5 krat), kar do sedaj ni bila uveljavljena praksa v tem segmentu separacij. Ugotovljeno je bilo tudi, da pomemben dejavnik predstavlja tudi hitrost pretoka mobilne faze (posredno, zaradi povratnega tlaka kolone), s čimer ima slednje vpliv na stopnjo hidratacije analitov ter s tem na stopnjo izraženosti hidrofilnih interakcij (konkurenčnih ionski izmenjavi) le-teh v koloni.

Nezanemarljiv vidik tako razvitega postopka separacije RNK je tudi ta, da je s tem pristopom možna uporaba običajnega tekočinskega kromatografa, brez radikalnih posegov v konfiguracijo instrumenta, namesto ionskega kromatografa.

Masno-spektrometrična detekcija

V primerjavi z drugimi biomolekulami (proteini, DNK) je v primeru RNK njen odziv na ESI ionizacijo svojevrsten, v prvi vrsti zaradi njene sekundarne/terciarne strukture, katera ob visoki stopnji ioniziranosti fosfatnih skupin (večkratna nabitost molekul) prispeva k široki porazdelitvi detektiranih ioniziranih oblik le-te, t.j. razmerja masa/naboj. Zaradi takega raztrosa signala je občutljivost detekcije RNK v primerjavi s proteini ali dvoverižno DNK bistveno manjša, kar potrjujejo tudi objave drugih raziskovalnih skupin.

Občutljivost MS detekcije RNK je tako v enakem velikostnem razredu kot je občutljivost pri UV detekciji le-te. Do določene mere je bilo možno izboljšati MS detekcijo RNK s post-kolonskim dodajanjem raztopin, ki znižujejo vsebnost vode eluentu (npr. propanol) ali so modifikatorji ionizacije (npr. hlapne baze). V tem smislu je bilo možno izboljšati MS detekcijo za faktor 2-4 krat, v primerjavi z detekcijo analitov, neposredno eluiranih iz kolone.

Z namenom radikalnejšega izboljšanja MS detekcije ter pridobiti vsaj informacijo o nukleotidni sestavi molekule, je bila uporabljena druga strategija ionizacije RNK: preko visokotemperaturnega ESI ionskega izvora in delne fragmentacije analitov v samem ionskem izvoru, kar je omogočilo detekcijo ionov posameznih gradnikov analitov. Taki pogoji ionizacije (in fragmentacije) znatno zmanjšajo število prostostnih stopenj molekul ter posledično pripomorejo k znatno občutljivejši detekciji. Selektivnost detekcije je bila izvedena preko druge fragmentacijske stopnje omenjenih ionov v trkovni celici masnega spektrometra (uporabljen je bil trojni kvadrupol), kjer je bila zasledovana izguba nevtralne molekule (angl. constant neutral loss mode), v našem primeru NH_3 . S tem je bilo moč zaznati vse 4 karakteristične gradnike RNK molekul. Poskusi s standardi so pokazali, da je možna tudi identifikacija metilacije citozinskih enot (pri analizi vzorcev slednjega nismo zasledili, saj je ta pojav precej manj pogost kot v primeru DNK). Detekcija analitov s primerljivo občutljivostjo je možna tako v anionski kot tudi v kationski obliki, zaradi amfoternosti analitov. Opravljena je bila tudi primerjava v občutljivosti in robustnosti detekcije dveh primerljivih masnih spektrometrov (tipa trojni kvadrupol) različnih proizvajalcev (AB Sciex in Thermo). Ugotovljeno je bilo, da je pri drugem proizvajalcu detekcija sicer nekoliko boljša, vendar pa so v prvem primeru nastavitve parametrov detekcije znatno enostavnejše (pri čemer je detekcija tudi bolj konsistentna), zaradi drugačne zasnove ionske optike.

Najzanimivejša in morda tudi najpomembnejša ugotovitev pa je bila ta, da nekatere molekule RNK (pridobljene raznih mešanic RNK molekul različnih aktivnosti) izkazujejo še posebej visok odziv (in ponovljiv vzorec) pri MS detekciji, medtem ko so njihovi odzivi pri UV detekciji (zasledovani simultano) povsem primerljivi in neizstopajoči v primerjavi z drugimi analiti v vzorcu. Zgolj na osnovi uporabljene metodologije je nemogoče zaključiti, ali imajo omenjene molekule posebej izraženo biološko aktivnost (kar naj bi sicer že same po sebi imele). Skoraj zagotovo pa je moč trditi, da v teh primerih gre za molekule z drugačno sekundarno/terciarno strukturo in manj prostostnimi stopnjami kot pri večini ostalih. Za potrditev te teze bi bilo seveda potrebno opraviti analize z drugimi, komplementarnimi spektroskopskimi tehnikami (izven konteksta projekta). Vkolikor bodo bodoče raziskave slednje potrdile, bo masno-spektrometrična detekcija imela bistveno večjo vlogo pri raziskavah RNK, kot jo je imela doslej.

Priprava in analiza vzorcev

Pomemben vidik analitike je tudi priprava vzorcev pred separacijo. Kljub možnosti selektivne MS detekcije je z ustrezno pripravo vzorcev možno znatno izboljšati občutljivost detekcije, tako na račun koncentriranja analitov kot tudi na račun zmanjšanja »kemijskega šuma« v vzorcih. Poleg komercialno dostopnih ekstraktov RNK (npr. iz *Torula utilis*) so bili pripravljene tudi različni vzorci RNK iz laboratorijsko gojenih kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*), različnih rastlinskih vzorcev (iz zelenih tkiv, različne vrste) in svežega nehomogeniziranega mleka (ki velja za bogat vir RNK). Pri ekstrakciji RNK iz tkiva ali celic (kvasovke, rastline) je bil najprej uporabljen nekoliko modificiran, a uveljavljen postopek s Trizol reagentom. Bistveni del priprave vzorca pa je temeljil na tem, da se je RNK selektivno prečistila in koncentrirala v izbranem velikostnem rangu preko večstopenjske ultrafiltracije. Uporabili smo ultrafiltracijski membrani s prepustnostjo 3 kDa oz. 10 kDa. Izkoristek RNK pri pripravi vzorcev je znašal nad 80 %. S tem je bilo možno selektivno izločiti tako visokomolekularne komponente (npr. proteine) iz vzorcev kot tudi koncentriranje pridobljenih analitov.

Plinsko kromatografska analiza nukleotidne sestave

Vzporedno z razvojem kromatografske separacije in MS detekcije je bil, zaradi priložnosti sodelovanja z Univerzo v Rio de Janeiru (prof.dr.Francisco Radler), razvit tudi postopek za analizo nukleotidne sestave izbranih molekul RNK s plinsko kromatografijo. Postopek je uporaben za različne tipe plinsko kromatografske detekcije: FID, MS, še posebej pa je za slednje primerna NPD detekcija; specifični molarni odzivi nukleotidov so predvidljivi in visoki, zaradi velikega molarnege deleža dušika v molekulah. Obenem se s tem izognemo kemijskemu šumu, izhajajočem iz ioniziranega ogljika. Nukleotidi se analizirajo v derivatizirani obliki, s predhodnim trimetilsililiranjem. Prednosti razvitega postopka so dobra topnost vseh analitov (problematičen je zlasti gvanin), enostavnost (raztapljanje in hidroliza potekata sočasno ter hitro), hitrost (skupen čas priprave pribl. 2 uri), občutljivost (najmanjša potrebna količina vzorca pribl. 10 µg), visoka robustnost na sledove vode (slednje je najpogostejši problem pri tovrstni derivatizaciji), enoznačnost nastalih derivatov (pri kompleksnih molekulah pogosto nastane več vzporednih produktov) ter nenazadnje možnost istočasne analize modificiranih nukleotidov (oksidacija, metilacija). Postopek je enakovredno primeren tako za analizo RNK kot tudi DNK vzorcev. S tem postopkom je, poleg možnosti analize stopnje metilacije, možna tudi analiza stopnje oksidacije nukleinskih kislin, kar predstavlja zelo uporabno orodje pri ugotavljanju oksidacijskega stresa organizmov, z možnostjo uporabe te metode v tržne namene (npr. personalizirana diagnostika).

5.Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Z vidika obsega projekta je stopnja realizacije zagotovo presegla prvotno načrtan okvir dela, zlasti na račun novih spoznanj pri delu z različnimi kromatografskimi stacionarnimi fazami, novimi idejnimi rešitvami pri razsoljevanju mobilne faze, spoznanjih o drugih možnostih za sorodne aplikacije ter nenazadnje z dodatnim razvojem na področju plinske kromatografije in sodelovanjem z raziskovalno skupino iz Brazilije. Z vidika zastavljenih ciljev pri prijavi projekta so bila tekom projekta potrebna določena odstopanja, in sicer glede tipa organizmov oz. vzorcev za izolacijo RNK ter v manjši meri v izbranem pristopu detekcije analitov.

6.Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Razvoj postopkov kromatografske separacije ter deloma tudi detekcije sta zahtevala znatno več časa in sredstev od prvotno predvidenega (vsaj 50 % več, tako časa kot sredstev). Posledično je bilo potrebno ostale časovne in finančne okvire projekta prilagoditi. Posledično zaradi nastalih časovnih, kot tudi deloma logističnih problemov (gojenje fitopatogene glive bi zahtevalo znatno več časa), so bili biološki vzorci bodisi pridobljeni v samem analiznem laboratoriju (kvasovke v tekočem gojišču) bodisi kupljeni (komercialni ekstrakti kvasovk, sveže mleko) oziroma nabrani (sveži rastlinski vzorci). Vendar je slednje, z vidika metodologije in osnovnega namena projekta, popolnoma irelevantno. V kontekstu projekta, izvor analizirane RNK nikakor ni relevanten z vidika analitike. Nasprotno, razvita analitika RNK je pričakovano primerna za različna področja molekularne biologije.

7.Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	4824346	Vir: COBISS.SI
		Direktna analiza ogljikovih hidratov v živalski plazmi z ionsko	

Naslov	SLO	kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo in pulzno amperometrično detekcijo, kot neinvazivno diagnostično orodje
	ANG	Direct analysis of carbohydrates in animal plasma by ion chromatography coupled with mass spectrometry and pulsed amperometric detection for use as a non-invasive diagnostic tool
Opis	SLO	<p>Objava prikazuje možnost uporabe elektrokemijske detekcije (ECD) sklopljene z ionsko kromatografijo in ESI tandemsko masno spektrometrijo (IC-ECD-ESI/MS/MS) za hitro oceno zdravstvenega stanja organizmov. Razmerje laktuloza/manitol (L/M) se lahko uporabi kot neinvazivni indikator absorpcijskih sposobnosti prebavil ter stanja črevesne sluznice. V tej študiji je bila opravljena ocena negativnih učinkov peroralno vnešenega nesteroidnega protivnetnega zdravila meloksikama na skupino psov. Razmerje laktuloza/manitol je bilo ugotovljeno z uporabo IC-ECD-ESI/MS/MS sklopljene tehnike. Ugotovljen je bil vpliv meloksikama na prepustnost prebavil. Koencim Q10 (CoQ10) je bil preizkušen z namenom ugotavljanja morebitne preprečitve poškodb prebavil s strani meloksikama. Ugotovljeno je bilo, da CoQ10 lahko predstavlja učinkovito preventivno zdravljenje. Poleg tega je bilo ugotovljeno, da je koncentracija glukoze v plazmi posredni indikator oksidativnega stanja krvi. Z namenom ugotavljanja pozitivnih učinkov antioksidantov (alfa-lipoinna kislina (ALA) in CoQ10) na raven glukoze pri piščancih, sta bila ALA in CoQ10 dodana kot prehranska dodatka krmi industrijsko vzrejenih piščancev. Rezultati pilotne študije kažejo, da se je raven glukoze v plazmi piščancev v skupini, krmljeni z CoQ10 in ALA, precej zmanjšala v primerjavi s kontrolno skupino. Ionska kromatografija (IC) z uporabo pulzne amperometrične detekcije (PAD) je bila primerjana z ionsko kromatografijo-tandemsko masno spektrometrijo (MS / MS) kot analitsko orodje za spremljanje ravnih ogljikovih hidratov v bioloških tekočinah. Novo razvita 2-pulzna oblika vala elektrokemijske detekcije uspešno prenese vplive matriksa bioloških vzorcev. Kontinuirno on-line razsoljevanje visokih koncentracij soli, ki se uporabljajo kot eluent za separacijo ogljikovih hidratov ločitve, omogoča sklopitev IC in MS tehnike. Za učinkovito ionizacijo ogljikovih hidratov je bila dodana raztopina 0.5 mM LiCl. Validacija metode je pokazala, da sta obe tehniki primerljivi. Predstavljeni sta prednosti obeh tehnik.</p>
	ANG	<p>The present paper demonstrates that electrochemical detection (ECD) coupled to ion chromatography and electrospray ionization tandem mass spectrometry (IC-ECD-ESI/MS/MS) can be used to rapidly estimate some indications of the health status of organisms. The lactulose to mannitol ratio (L/M) is used as a non-invasive assay to investigate small intestinal absorption pathways and mucosal integrity. In the present study, an evaluation of the negative effects of nonsteroidal anti-inflammatory drug meloxicam perorally administered to a group of dogs was carried out by determining the lactulose/mannitol index using the IC-ECD-ESI/MS/MS hyphenated technique. According to the results of the study, meloxicam altered gastrointestinal permeability. Coenzyme Q10 (CoQ10) was tested to determine if it could prevent meloxicam induced gastrointestinal damage and it was found that CoQ10 could be an effective preventive treatment. Furthermore, plasma glucose concentration level was determined to be an indirect indicator of the oxidative state in the blood. To find out the beneficial effects of a double antioxidant combination (alpha-lipoic acid (ALA) and CoQ10) on the total glucose level in chickens, ALA and CoQ10 were provided as food additives in factory farm raised chicken. The results of the pilot study indicate that the glucose level in the plasma of chickens group fed with CoQ10 and ALA was significantly decreased compared to the control group. Ion chromatography (IC) utilizing pulsed amperometric detection (PAD) was compared to ion chromatography coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) as an analytical tool for monitoring the carbohydrate level in biological fluids. In electrochemical detection, the newly developed two-pulse waveform successfully withstands matrix effects</p>

		in biological samples. Continuous on-line desalting of the high salt concentrations used as the eluent for carbohydrate separation from the anion-exchange column allows coupling of IC and MS techniques. A make-up solution (0.5 mM LiCl) was delivered prior to MS detection for efficient ionization of eluted carbohydrates. Method validation showed that both used techniques are practically comparable and some advantages of each are presented.
	Objavljeno v	Elsevier; Journal of chromatography; 2011; Vol. 879, issue 31; str. 3700-3706; Impact Factor: 2.888; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.215; WoS: CO, EA; Avtorji / Authors: Kotnik Darja, Šmidovnik Andrej, Jazbec Križman Petra, Križman Mitja, Prošek Mirko
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	5194266 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Kvantitativna zveza med strukturo in mobilnostjo imidazolinskih receptorskih ligandov v kapilarni elektroforezi s ciklodekstrinskim medijem
		<i>ANG</i> Quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE
	Opis	<i>SLO</i> Tekom študije kvantitativne zveze struktura-mobilnost (QSMR) smo proučili relativne migracijske čase 11 gvanidinskih/imidazolinskih spojin, imidazolinske receptorske ligande s tehnko CE ob uporabi α -, β -, ali γ -CD (ciklodekstrinov), z uporabo linearnih in nelinearnih modelirnih metod. Analizirani ligandi in njihovi inkluzijski kompleksi s CD so bili preučeni in optimizirani na semiempirični parametrizirani stopnji 3. Teorija funkcionalne gostote, npr. B3LYP/6-31G+(d,p)/3-21G(d)/STO-3G(d,p)/STO-3G(d), in ab initio teorija, npr. HF/3-21G(d)/STO-3G(d), sta bili uporabljeni za računske molekulske deskriptorje optimiziranih ligandov in njihovih kompleksov. Predvidene lastnosti razvitih QSMR modelov so bile testirane z uporabo navzkrižne validacije in zunanjega nabora. Dobljeni rezultati za vrednosti Q2 (0.869, 0.911, in 0.966 za CE sistem z α -, β -, in γ -CD) in povprečna napaka predikcije (0.239, 0.242, in 0.288 za α -, β -, and γ -CD) so bile dokazane z visoko prediktivno stopnjo predloženih modelov. Večciljni QSMR model je bil narejen z uporabo ligandov deskriptorjev (X) in relativnih migracijskih časov v prisotnosti α -CD (Y1), β -CD (Y2) in γ -CD (Y3). Večciljni QSMR model se lahko uporablja kot začetno presejalno orodje za migracijsko obnašanje drugih gvanidinsko/imidazolinskih spojin v CE sistemu v prisotnosti α -, β - in γ -CD.
		<i>ANG</i> The performed quantitative structure-mobility relationship (QSMR) study has investigated relative migration times of 11 guanidine/imidazoline derivatives, imidazoline receptor ligands, in CE system containing one of CDs, α -, β -, or γ -CD, using linear and nonlinear modeling methods. The analyzed ligands and their inclusion complexes with CDs were fully examined and optimized at semiempirical parametrized model 3 level. The density functional theory, such as B3LYP/6-31G+(d,p)/3-21G(d)/STO-3G(d,p)/STO-3G(d), and ab initio theory, such as HF/3-21G(d)/STO-3G(d), were applied for molecular descriptors computation of the optimized ligands and their complexes. Predictive performances of the developed QSMR models were tested by use of the cross-validation and external test set prediction. Obtained results for Q2 values (0.869, 0.911, and 0.966 for CE system containing α -, β -, and γ -CD, respectively) and root mean squared error of prediction (0.239, 0.242, and 0.288 for α -, β -, and γ -CD, respectively) were proved high predictive power of the proposed models. Finally, multitarget QSMR model, using the ligands descriptors (X) and the relative migration time in presence of α -CD (Y1), β -CD (Y2), and γ -CD (Y3), has been created. The multitarget QSMR model can be used as initial screening predictive tool for CE migration behavior of other related guanidine/imidazoline derivatives in presence of α -, β -, and γ -CD.

	Objavljeno v	VCH; Electrophoresis; 2013; Vol. 34, no. 3; str. 471-482; Impact Factor: 3.303; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.215; A': 1; WoS: CO, EA; Avtorji / Authors: Filipic Slavica, Nikolić Katarina, Vovk Irena, Križman Mitja, Agbaba Danica	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	4786202	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Pregled razvoja in aplikacij sklopljenih tehnik v analizi hrane
		ANG	Overview of the development and application of the hyphenated techniques in nutritional analysis
	Opis	SLO	V prispevku je podan pregled razvoja nekaterih analiznih metod za kvantitativno določanje spojin na prehranbenem področju, s poudarkom na izbranih sklopljenih analiznih tehnikah. Večji del je posvečen pregledu razvoja analiznih orodij za rutinske analize ogljikovih hidratov in maščob v bioloških vzorcih, mnoge med njimi vpeljane v našem laboratoriju. Rokovanje z biološkimi vzorci predstavlja velik izziv, saj lahko endogene spojine zakrijejo tarčni analit in kjer koelucijski učinki večih spojin, prisotnih v različnih količinah, lahko ovirajo integracijo vrhov izbranih analitov. Da premostimo omenjene izzive, so bile v laboratorijsko prakso uvedene sklopljene analizne tehnike. Predstavljene so nekatere rešitve, s posebnim poudarkom na učinkovitem vmesniku med tenkoplastno kromatografijo in masno spektroskopijo ter povezava med tenkoplastno kromatografijo in plinsko kromatografijo. Za premagovanje bioanalitskih problemov je bila pred kratkim na Kemijskem inštitutu v Ljubljani inštalirana sklopitev ionskega kromatografa in masnega spektrometra, hibrid RF/DC kvadrupola in linearne ionske pasti. Predstavljene so razvite metode za določevanje ogljikovih hidratov, uporabljajoč ionsko kromatografijo v povezavi z masno spektrometrijo in ionsko kromatografijo s pulzno amperometrično detekcijo. Obstoječ pregledni članek predstavlja naše raziskovalno delo na področju modernih sklopljenih tehnik. V članku so izpostavljeni signifikantni doprinosi na področju analitike ogljikovih hidratov in lipidov z izbranimi sklopljenimi tehnikami.
		ANG	The development of some sensitive assays for quantitative nutritional analysis with an emphasis on selected hyphenated analytical techniques is reviewed in the present paper. The majority of work is dedicated to reviewing the development of analytical tools for routine analysis of carbohydrates and lipids in biological samples, many of them introduced in our laboratory. Handling biological matrices, where endogenous compounds can mask the analyte of interest or where the occurrence of the coelution effect of several compounds present in different amounts hinders the analyte's peak integration, is a major challenge. To overcome this challenge, hyphenated techniques have become widespread in laboratory practice. Some of these techniques are reviewed, with special attention given to an effective on-line interface for thin-layer chromatography-mass spectrometry and on-line coupling thin-layer chromatography-gas chromatography. Recently introduced an on-line coupling of ion chromatograph and hybrid RF/DC quadrupole-linear ion trap mass spectrometer represent an analytical tool for the solution of bioanalytical problems. Developed methods using ion chromatography- pulsed amperometric detection and ion chromatography-mass spectrometry techniques for the quantitative evaluation of sugars are presented. This paper represents basic contributions of our research work connected with some of modern hyphenated techniques. However, this review is restricted to the published papers to be significant developments or improvements during the last three decades.
	Objavljeno v	Slovensko kemijsko društvo =Slovenian Chemical Society; Acta chimica slovenica; 2011; Vol. 58, no. 2; str. 203-211; Impact Factor: 1.328; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 3.001;	

		WoS: DY; Avtorji / Authors: Kotnik Darja, Šmidovnik Andrej, Jazbec Križman Petra, Križman Mitja, Prošek Mirko
	Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek
4.	COBISS ID	5157402 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Kvantitativno določanje nizkomolekularnih antioksidantov in njihovih učinkov na različne antioksidante v piščančji krvni plazmi</p> <p><i>ANG</i> Quantitative determination of low molecular weight antioxidants and their effects on different antioxidants in chicken blood plasma</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Antioksidanti v telesu se nahajajo v ravnotežju ter tvorijo zaščitno antioksidativno mrežo, katera štiti organizme pred oksidacijskim stresom. Za dokaze te hipoteze smo razvili primerne metode za določitev vsebnosti antioksidantov in njihove aktivnosti v piščančji krvni plazmi. Slednje nam je omogočilo razložiti celokupni status antioksidativne aktivnosti živali med kontrolirano industrijsko rejo. Ocenili smo učinke eksogenega koencima Q10 in α-lipoične kisline na znižanje oksidativnega stresa živali. Zasedovali smo fizično in zdravstveno stanje živali med 40-dnevnim vzrejnim obdobjem. Pozitivni učinki dodatkov so bili ocenjeni na podlagi izmerjenih koncentracij nizkomolekularnih antioksidantov (koencim Q10, α-lipoična kislina, α-tokoferol, lutein in zeaksatin) in antioksidativnih encimov (superoksid dismutaza, glutation reduktaza), holesterola in glukoze v plazmi ter izmerili skupno antioksidativno kapaciteto. Kvantitativna analiza izbranih spojin je bila opravljena s kromatografskimi, spektroskopskimi in elektrometričnimi metodami. Dodatek antioksidantov je imel pozitiven učinek na delovanje antioksidativne mreže.</p> <p><i>ANG</i> Antioxidants in the body are in balance, and form a network that protects living organisms against oxidative stress. To prove this hypothesis, we developed suitable methods for assessing the amount of antioxidants and their antioxidant activity in the chickens' plasma, which enable us to explain the overall antioxidant status of the animals during the controlled industrial raise. The effects of exogenous coenzyme Q10, and α-lipoic acid on the reduction of oxidative stress in the animal body were assessed. The physical and the health conditions of chickens during the raising period of 40 days were followed. The benefits of additives were estimated through the measured concentrations of selected low molecular weight antioxidants (coenzyme Q10, α-lipoic acid, α-tocopherol, lutein and zeaxanthin) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione reductase), cholesterol and glucose in plasma and measurements of total antioxidant capacity. Quantitative analyses of selected substances were done with different chromatographic, spectroscopic and electrometric methods. The addition of antioxidants has positive effects on the activity of antioxidant network.</p>
	Objavljeno v	Scientific Research Pub.; Journal of biomedical science and engineering; 2012; Vol. 5, no. 12; str. 743-754; Avtorji / Authors: Jazbec Križman Petra, Šmidovnik Andrej, Golc-Wondra Alenka, Černelič Katarina, Kotnik Darja, Križman Mitja, Prošek Mirko, Volk Marko, Holcman Antonija, Nemeč Alenka
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	5197338 Vir: vpis v poročilo
	Naslov	<i>SLO</i> GC analiza DNK nukleobaz v TMS-derivatizirani obliki

		ANG	GC analysis of DNA nucleobases as TMS-derivatives
Opis		SLO	Nukleobaze kot gradniki genetskega materiala so izpostavljene različnim modifikacijam tekom življenjskega cikla celice, večinoma epigenetskim spremembam kot je metilacija, in oksidaciji kot posledici anaerobnega metabolizma. Najbolj znana derivata takih sprememb sta 5-metilcitozin in 8-hidroksigvanin, prihaja pa tudi do drugih oksidacijskih produktov. Študije metilacije DNK in stopnje oksidativnih poškodb lahko služijo kot zgodnji prediktorji patogeneze in karcinogeneze, pa tudi kot ocena posameznikov, podvrženim visokemu tveganju, ter kot ocena učinkovitosti zdravil pri preprečevanju oksidativnih poškodb. Plinska kromatografija predstavlja praktično orodje za analizo nuklotidne sestave DNK, vključno z modifikacijami le-teh. Pred analizo je potrebno DNK hidrolizirati in nukleobaze pretvoriti v hlapne produkte, običajno trimetilsilil (TMS) derivate. Postopek je potrebno izvajati pod striktno nadzorovanimi pogoji, v izogib nezaželenim reakcijskim produktom in z namenom dobiti ponovljive rezultate. Splošni problem pri TMS derivatih predstavljajo ostanki vode v vzorcu. V predstavljenem delu je predstavljen postopek priprave DNK nukleobaz, vključujoč stopnjo hidrolize in sililiranja. Postopek se je izkazal kot zelo robusten v smislu ponovljivosti nastanka TMS-derivatov, ter kot neobčutljiv na prisotnost ostankov vode.
		ANG	Nucleobases as genetic material building blocks are exposed to several modifications throughout the cellular life cycle, mostly to epigenetic mechanisms like methylation, and to oxidation as the result of aerobic metabolism. The most known studied products of such modifications are 5-methylcytosine and 8-hydroxyguanine, but there is also a multitude of other oxidation products being generated. Studies of DNA methylation and oxidative damage rate can serve as early predictors of pathogenesis and carcinogenesis, as well as for assessment of high-risk individuals and for evaluation of drug effectiveness in oxidative damage prevention. Gas chromatography provides a convenient means for analyzing nucleobase composition of DNA, including modified nucleobases. Before analysis, DNA needs to be hydrolyzed and the nucleobases converted into volatile products, usually into trimethylsilyl (TMS) derivatives. However, the procedure must be carried out under strictly controlled conditions in order to obtain consistent results and to avoid unwanted reaction products. A common problem in obtaining TMS derivatives is the presence of residual water in the sample. In the present work, a sample preparation workflow for DNA nucleobases is presented, including DNA hydrolysis and silylation. The procedure proved to be consistent in terms of reproducibility of TMS-products and to be relatively insensitive against sample residual water.
Šifra	B.03	Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
Objavljeno v	Abstract book : 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GC x GC Symposium. Riva del Garda: [s. n.], 2012, str. 457; Avtorji / Authors: KRIŽMAN, Mitja, JUNIOR M. NOVAES, Fábio, RAMOS, Maria da Conceição Klaus V., RADLER DE AQUINO NETO, Francisco.		
Tipologija	1.12	Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
2.	COBISS ID	x	Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO	Sodelovanje z družbo Lek d.d. v razvoju in uvajanju novih analiznih metod za potrebe družbe ter izvajanju študij	
	ANG	Cooperation with company Lek d.d. in the development of new analytical methods for the company and performing studies	
Opis	SLO	Sodelovanje je potekalo zaradi potreb uvedbe različnih analiznih metod, ki temeljijo na različnih tehnikah; IC-MS, LC-MS in GC-MS. Razvitih je bilo 8 novih analiznih postopkov za določanje razpadnih produktov substanc, analize okoljskih vzorcev ter vsebnosti glavnih komponent v proizvodih.	

		ANG	Cooperation was due to the needs to implement various IC-MS, LC-MS and GC-MS methods in Lek d.d.. Eight new analytical methods were developed for the determination of decomposition products, analysis of environmental samples and determination of main active substances in final products.
Šifra	F.23		Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
Objavljeno v	x		
Tipologija	2.12		Končno poročilo o rezultatih raziskav
3.	COBISS ID	x	Vir: vpis v poročilo
Naslov	SLO		Sodelovanje z družbo Melamin v razvoju novih analiznih metod za potrebe družbe
	ANG		Cooperation with company Melamin in the development of new analytical methods for the company
Opis	SLO		Sodelovanje je potekalo zaradi potreb uvedbe LC-MS tehnike v Melaminu. Razvita sta bila dva nova analizna postopka za določanje sestave melamin-formaldehidnih smol.
	ANG		Cooperation was due to the needs to implement LC-MS technique in Melamin. Two new analytical procedures were developed for composition determination of melamine-formaldehyde resins.
Šifra	F.23		Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
Objavljeno v	x		
Tipologija	3.25		Druga izvedena dela

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

V obdobju trajanja projekta Z4-3679 je bil nosilec vključen tudi v raziskave izboljšanja termične stabilnosti jedilnih olj pri višjih temperaturah s poudarkom na njihovi antioksidativni zaščiti (v sodelovanju s centrom odličnosti CO-ENFIST), dokončan je bil razvoj sklopljene tehnike TLCxGC za analitiko maščobnih kislin, opravljene so bile klinične študije metabolitov črevesne flore (v sodelovanju z Univerzitetnim kliničnim centrom Ljubljana). Nosilec projekta je sodeloval z drugimi raziskovalnimi skupinami znotraj Kemijskega inštituta ter z Univerzo v Beogradu. Nosilec projekta je bil tudi vključen v številne projekte sodelovanja z industrijo, zlasti farmacevtsko, pri razvoju novih analiznih postopkov.

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

10.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Pridobljena znanja in postopki v sklopu projekta so uporabni na področju različnih znanstvenih disciplin za analize kratkoverižnih RNK molekul (biokemija, farmacija, agronomija, veterina in medicina). V primerjavi z uveljavljenimi molekularno genetskimi tehnikami predstavljajo hitrejšo in cenovno ugodnejšo analizo orodje. Tu velja izpostaviti, da razvoj postopkov v sklopu projekta ni bil primarno namenjen direktni zamenjavi uveljavljenih analiznih protokolov, temveč komplementarnih orodij, ki bi predstavljala alternativo in dopolnitev obstoječih postopkov, zlasti ko gre za presejalne teste in iskanje potencialnih markerjev, kjer je zaželjena enostavna priprava vzorcev, brez motečih vplivov matriksa vzorca. Uporabnost postopkov separacije, detekcije in priprave vzorcev RNK je zato široka: od raziskav v kmetijstvu do kliničnih raziskav. Obenem pa možnost uporabe LC-MS instrumentov, namesto težje dostopnih IC-MS instrumentov, odpira večje število priložnosti za vpeljavo teh postopkov v druge laboratorije. Pri kliničnih raziskavah je še dodatno zanimiv postopek za analizo nukleotidne sestave DNK (s plinsko kromatografijo), s čimer je možno ugotavljati stopnjo oksidacije le-te oz. stopnjo

oksidacijskega stresa organizma. Velja poudariti tudi, da so posamezni deli postopkov (separacija, detekcija, priprava vzorcev) prav tako potencialno uporabni oz. prenosljivi na druge, sorodne aplikacije.

ANG

The developed procedures and the knowledge gained during the project are useful in different scientific disciplines for analyses of short-chained RNA molecules (biochemistry, pharmacy, agronomy, veterinary and human medicine). In comparison to the established molecular genetic techniques, these procedures represent a faster and more inexpensive alternative. It should be emphasized that the development of these new procedures was not primarily intended as a replacement of existing analytical protocols. Rather, it is intended as complementary tool, an alternative and/or an upgrade of existing procedures, especially in screening tests and in gathering potential markers where simplicity of sample preparation is preferred, yet still without deleterious sample matrix effects. The usefulness of RNA separation, detection and sample preparation procedures is thus quite broad: from research in the agronomy field to clinical tests. At the same time, the possibility of using LC-MS equipment instead of hardly accessible IC-MS counterparts for such analyses opens more opportunities for implementing these procedures in other laboratories. The procedure for DNA nucleotide composition analysis (with gas chromatography) is additionally interesting for assessment of organism's oxidation stress level. The procedures' individual segments (separation, detection, sample preparation) are also individually useful and transferrable to other similar applications.

10.2.Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Farmacevtska industrija bo v prihodnosti komercializirala tudi pripravke na osnovi kratkoverižnih RNK molekul (sodeč po številu patentov), zato bo uporabnost razvitih postopkov zelo aktualna pri razvojnem delu in kontroli kakovosti omenjenih pripravkov. Posledično je pričakovati, da bo že sicer dobro sodelovanje med farmacevtsko industrijo in Kemijskim inštitutom, bilo še intenzivnejše. Metodologija pa ima svoje potencialno mesto tudi v klinični diagnostiki, s čimer bi lahko znatno pocenili oziroma uvedli nove presejalne teste za nekatere bolezni, in v kmetijstvu ter veterinarski stroki. Na področju klinične diagnostike (zasebne ali v okviru zdravstvenih zavodov) obstaja tudi možnost izvajanja analiz z namenom ugotavljanja oksidacijskega stresa. Nenazadnje pa idejna zasnova novega tipa razsoljevalca mobilne faze ponuja dobre možnosti z vidika podjetniške iniciative za izdelavo in prodajo tovrstnih naprav z visoko dodano vrednostjo.

ANG

In the near future, pharmaceutical industry will commercialize drugs based on short-chained RNA molecules (based on the number of relative patents), thus the utility of these analytical procedures will be useful in the development and quality control of these pharma products. Consequentially, it can be expected that the already good collaboration between the National Institute of Chemistry and the pharmaceutical industry will be further strengthened. This methodology has also its place in clinical diagnostics where it could cut down the costs for screening tests for some diseases, as well as in agriculture and in veterinary medicine. In the field of clinical diagnostics, there is also the possibility to conduct oxidation stress tests (private practice or within established health institutions). Last but not least, the new concept for a mobile phase desalter opens up the opportunity for an entrepreneurship initiative, in producing and selling devices with a high added value.

11.Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

--

12. Samo za aplikativne projekte in podoktorske projekte iz gospodarstva!
Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visokošolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input style="width: 150px;" type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input style="width: 150px;" type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input style="width: 150px;" type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo: <input style="width: 150px;" type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete					
	Varovanje okolja in trajnostni					

G.06.	razvoj	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

13.Pomen raziskovanja za sofinancerje¹²

	Sofinancer		
1.	Naziv		
	Naslov		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja	Šifra	
		1.	
		2.	
		3.	
		4.	
		5.	
	Komentar		
	Ocena		

14.Izjemni dosežek v letu 2012¹³**14.1. Izjemni znanstveni dosežek**

Nosilec projekta, skupaj s kolegi iz raziskovalne skupine LADETEC iz Brazilije, je uspešno dokončal postopek za analizo nukleotidne sestave nukleinskih kislin s plinsko kromatografijo. Za uspešno analitiko je bila potrebna kritična izbira posameznih komponent sestavnih delov GC sistema (injektorski liner, stacionarna faza kolone itd.), zaradi visoke adsorptivnosti analitov na silika površine. Zaradi navedenega, je bilo ob uporabi inertnih komponent (deaktivirana stac.faza, kovinski liner) možno znatno izboljšanje občutljivosti signala.

14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Nosilec projekta je bil odgovoren za razvoj LC-MS analizne metode za določanje vsebnosti nitroksolina, za potrebe farmacevtske industrije. Po razpoložljivih podatkih, je to prva tovrstna analizna metoda, ki jo je možno izvajati na LC-MS instrumentu. Dosedanji postopki niso bili uporabni za delo na LC-MS instrumentih (zgolj za HPLC-UV), ker so vsebovali nehlapne eluente

v mobilni fazi.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Kemijski inštitut

Mitja Križman

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	25.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-RPROJ-ZP-2013/210

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11) [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen, izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite / prepisite skladno z obrazcem "izjava sofinancerja" <http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>, ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

¹³ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/>. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2013 v1.00

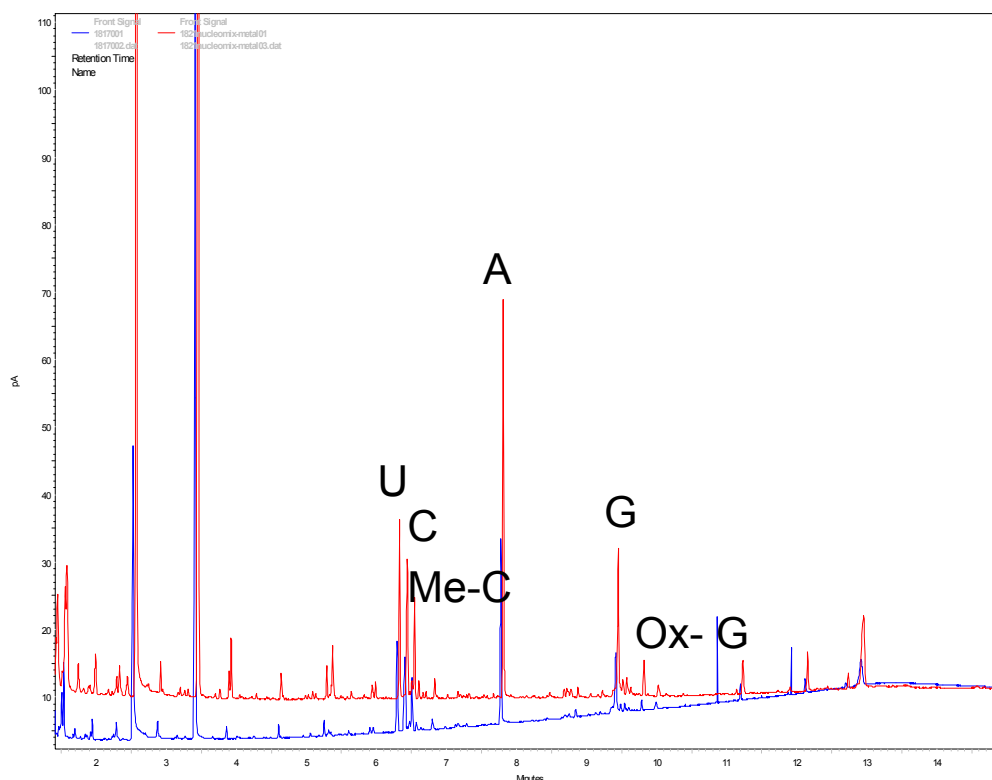
21-AF-F1-68-58-00-CF-19-59-76-F9-EF-7C-8D-5B-E0-84-90-D1-C8

BIOTEHNIKA

Področje: 4.03 Rastlinska produkcija in predelava

Dosežek 1:GC analitika nukleobaz v obliki TMS derivatov

Vir: KRIŽMAN, Mitja, JUNIOR M. NOVAES, Fábio, RAMOS, Maria da Conceição Klaus V., RADLER DE AQUINO NETO, Francisco. GC analysis of DNA nucleobases as TMS-derivatives. V: Palazzo dei Congressi, Riva del Garda, Italy, May 27 - June 1, 2012. *Abstract book : 36th International Symposium on Capillary Chromatography and 9th GC x GC Symposium*. Riva del Garda: [s. n.], 2012, str. 457.



Kromatogram prikazuje primerjavo analize nukleotidne sestave, preko njihovih TMS derivatov, oksidirane RNK z pri injiciranju v inertni injektorski liner (rdeča) in običajni liner (modra). Še posebej je razlika v občutljivosti izražena pri kromatografskem vrhu 8-hidroksigvanina (Ox-G, 9.8 min), najpogostejšega oksidacijskega produkta nukleinskih kislin in pokazatelja oksidacijskega stresa. Najverjetnejši razlog za slednje je v večji polarosti analita, v primerjavi z ostalimi TMS derivati nukleotidov, ter posledično v večji stopnji adsorpcije le-tega na aktivnih površinah v GC sistemu (ostali derivati: A-adenin, C-citozin, U-uracil, Me-C – 5-metilcitozin). Zaradi sorazmerno večje adsorpcije analita (v primerjavi z ostalimi analiti) lahko pride do napačne interpretacije (v tem primeru oksidacije RNK). S pravilno izbiro eksperimentalnih pogojev se je tako v največji meri možno izogniti skritim, a pomembnim sistematičnim napakam. Analizni postopek je enakovredno uporaben tudi za analize DNK.