

EXPERIMENTÁLNÍ URČOVÁNÍ ATOMOVÝCH NÁBOJŮ A NÁBOJOVÝCH HUSTOT POMOCÍ RENTGENOSTRUKTURNÍ ANALÝZY MONOKRYSTALŮ

MIROSLAV ŠLOUF

Katedra anorganické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 40 Praha 2
e-mail: slouf@imc.cas.cz

Došlo dne 4.VII.2001

Klíčová slova: rentgenostrukturní analýza, nábojové hustoty, multipólové upřesňování, elektronové hustoty

Obsah

1. Úvod
2. Základní pojmy
3. Standardní rentgenostrukturní analýza
 - 3.1. Model nezávislých atomů
 - 3.2. Nedostatky modelu nezávislých atomů
4. Deformační elektronové hustoty
5. Určování atomových nábojů
6. Určování nábojových hustot v krystalech
 - 6.1. Multipólové upřesňování
 - 6.2. Další možnosti
7. Shrnutí

1. Úvod

Výsledky rentgenostrukturní analýzy monokrystalů jsou využívány už více než 80 let v různých oblastech vědy. V krystalech jsou rentgenové paprsky difraktovány převážně elektrony, difrakce na jádrech atomů je zanedbatelná. Díky silné přitažlivé interakci mezi záporně nabitými elektrony a kladně nabitými jádry se naprostá většina elektronů vyskytuje v bezprostředním okolí jader atomů. Na tomto faktu je založena standardní rentgenostrukturní analýza, která spočívá ve vyhledání maxim elektronové hustoty v krystalu a jejich přiřazení jednotlivým atomům. Typickým výsledkem standardní rentgenostrukturní analýzy je tudíž kompletní informace o polohách atomů v krystalu, jinými slovy krystalová struktura.

Kdyby se krystal skládal z neinteragujících atomů, všechny atomy by byly neutrální a veškerá elektronová hustota by byla rozmístěna sféricky v okolí atomových jader. Atomy však spolu interagují, což se může projevit v zásadě dvěma způsoby: 1) elektronegativnější atomy odebírají elektronovou hustotu atomům elektro pozitivnější a vznikají ionty, 2) některé elektrony se účastní chemických vazeb nebo jsou lokalizovány v ne vazebných elektronových párech, takže jsou kolem atomových jader rozmístěny nesféricky. Toto pojednání se zabývá především dvěma rozšířeními standardní rentgenostrukturní analýzy: 1) kappa upřesňováním¹, které umožňuje určit atomové náboje a 2) multipólovým upřesňováním², které

umožňuje zviditelnit nesférickou elektronovou hustotu v krystalu, to jest například kovalentní vazby a ne vazebné elektronové páry.

2. Základní pojmy

V rentgenostrukturní analýze měříme intenzity záření I_{hkl} difraktovaného na krystalových rovinách (hkl), které jsou úměrné čtverci absolutní hodnoty strukturního faktoru F_{hkl} :

$$I_{hkl} \approx |F_{hkl}|^2 \quad (1)$$

Strukturní faktory jsou obecně komplexní čísla, což můžeme vyjádřit pomocí rovnice:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(\varphi_{hkl}) \quad (2)$$

kde φ_{hkl} jsou fáze a $|F_{hkl}|$ amplitudy strukturních faktorů. Skutečnost, že experiment poskytuje pouze amplitudy $|F_{hkl}|$, zatímco k následnému určení krystalové struktury jsou nezbytné hodnoty F_{hkl} se nazývá fázový problém rentgenostrukturní analýzy. Přesnému popisu a řešení fázového problému je věnována řada učebnic^{3,4}. Elektronovou hustotu v krystalu $\rho(x, y, z)$ v místě daném frakčními souřadnicemi (x, y, z) počítáme z hodnot strukturních faktorů:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (3)$$

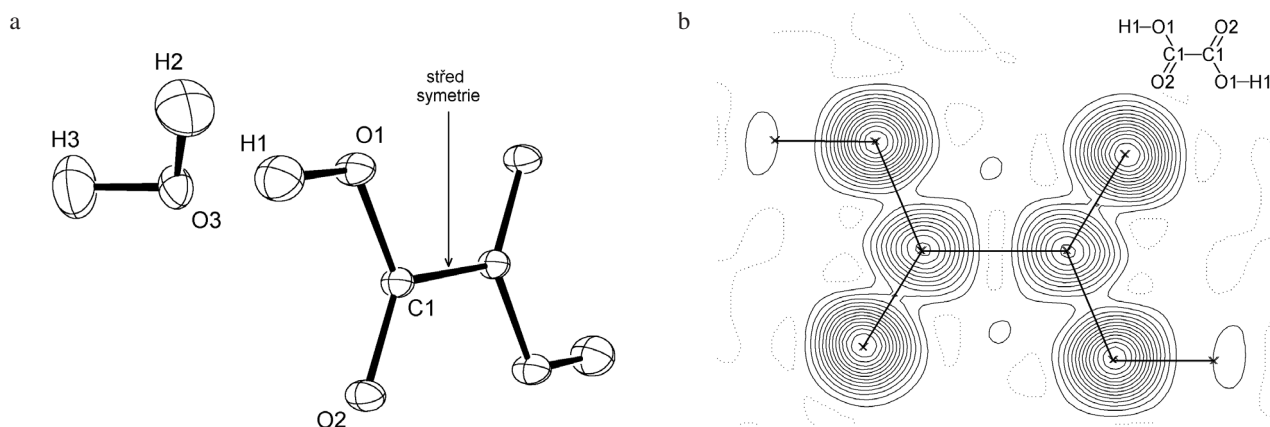
kde sumace probíhá přes všechny indexy h, k, l a V je objem základní buňky. Strukturní faktor z předchozích dvou rovnic udává intenzitu záření rozptýlenou jednou základní buňkou krystalu a získá se jako součet atomových rozptylových faktorů, přičemž je nutno vzít v úvahu fázové rozdíly a teplotní pohyby atomů:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp[2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)] T_j \quad (4)$$

Sčítá se přes všechny atomy $j = 1, 2, \dots, N$ v buňce, f_j je atomový rozptylový faktor udávající rozptyl záření na j -tém atomu, x_j, y_j a z_j jsou frakční souřadnice atomu a T_j je teplotní faktor popisující vliv teplotního pohybu j -tého atomu. Atomový rozptylový faktor f_j je spojen s elektronovou hustotou ρ_j na j -tém atomu vztahem:

$$f_j(\mathbf{S}) = \int \rho_j(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (5)$$

kde \mathbf{S} je difrakční vektor udávající směr difraktovaného záření a \mathbf{r} je polohový vektor udávající polohu vzhledem k jádru j -tého atomu. Z předchozích vztahů vyplývá, že v konečném důsledku je intenzita difraktovaného záření, kterou měříme při



Obr. 1. Výsledky standardní rentgenostrukturní analýzy pro krystal dihydrátu kyseliny oxalové, modifikace α : a) IAM model poskytuje polohy a teplotní parametry atomů, atomy se s 50 % pravděpodobností nalézají uvnitř termálních elipsoidů, očíslovány jsou pouze symetricky nezávislé atomy; b) řez mapou elektronové hustoty v rovině molekuly oxalové kyseliny, atomy se nacházejí v maximech elektronové hustoty, kontury na mapě jsou po $1,25 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$, kladné vrstevnice jsou plné čáry, nulové vrstevnice jsou tečkované; převzato z práce¹⁴

difrakčních experimentech, funkcí elektronových hustot na jednotlivých atomech v krystalu. Různé modely popisované v následujících kapitolách se liší právě tím, jakým způsobem definují funkci $\rho_j(\mathbf{r})$ popisující elektronovou hustotu na atomech.

Při samotné rentgenostrukturní analýze se dodržuje zhruba následující postup:

- Pomocí difraktometru se změří intenzity difraktovaného záření I_{hkl} z mnoha různých krystalových rovin (hkl).
- Z intenzit difraktovaného záření se získají absolutní hodnoty strukturálních faktorů $|F_{hkl}|$, v nichž je ukryta informace o polohách atomů, jak je patrné z rovnice (4).
- Vyřeší se fázový problém rentgenostrukturní analýzy a získá se první model krystalové struktury. Při použití rychlých počítačů a moderních programů bývá řešení fázového problému ve většině případů poměrně snadné.
- Upřesní se krystalová struktura, protože model získaný v předchozím kroku je zpravidla velmi hrubý. Často nejsou ještě známy polohy všech atomů a polohy většiny ostatních atomů jsou nepřesné. K upřesňování krystalové struktury se používá nejčastěji metoda nejmenších čtverců^{3,4}. Metodou nejmenších čtverců se minimalizují rozdíly mezi amplitudami strukturálních faktorů získaných z experimentu (rovnice (1)) a hodnotami strukturálních faktorů získaných výpočtem (rovnice (4)). Dohledáním dalších atomů a jemnými změnami parametrů atomů už nalezených se snažíme dosáhnout co nejlepší shody mezi vypočtenými a pozorovanými strukturálními faktory. Ve standardní rentgenostrukturní analýze jsou měněnými parametry polohy atomů a teplotní faktory. Pokud chceme pomocí kappa upřesnění určit atomové náboje, přibudou další parametry určující například počty valenčních elektronů. Pokud chceme pomocí multipólového upřesnění určit elektronovou hustotu v krystalu, musí se přidat ještě celá řada tzv. multipólových parametrů.

Pro určování atomových nábojů pomocí kappa upřesňování je nutné mít k dispozici přesnější a kvalitnější data, než je obvyklé ve standardní rentgenostrukturní analýze. Ještě kvalitnějších dat je zapotřebí pro určování nábojových hustot v krystalu pomocí multipólového upřesňování. Data se obvykle měří za nízkých teplot kolem 100 K, aby se minimalizoval

teplotní pohyb atomů, který při studiích nábojových hustot působí rušivě. Dále je nutné změřit difrakce s vysokými difrakčními úhly θ , aby bylo dosaženo vyššího rozlišení na mapách elektronových hustot. Pro standardní rentgenostrukturní analýzu postačují nízkouhlové difrakce se $\sin\theta/\lambda \leq 0,6 \text{ \AA}^{-1}$, kde λ je vlnová délka použitého rentgenového záření. Pro určování atomových nábojů je vhodné změřit i difrakce se $\sin\theta/\lambda \geq 0,6 \text{ \AA}^{-1}$ a pro studia nábojových hustot jsou nezbytné i vysokouhlové difrakce se $\sin\theta/\lambda \geq 0,9 \text{ \AA}^{-1}$.

3. Standardní rentgenostrukturní analýza

3.1. Model nezávislých atomů

Ve standardní rentgenostrukturní analýze se předpokládá, že krystal se skládá z navzájem neinteragujících atomů. Lze si jej tedy představit jako soubor sféricky symetrických atomů s pevně danou velikostí a pevně daným počtem elektronů. Odpovídající model se jmenuje model nezávislých atomů (Independent Atom Model – IAM) a elektronová hustota na atomu je definována následovně:

$$\rho_{\text{atom}}(r) = \textit{sféricky_symetrická_funkce} \quad (6)$$

Pomocí IAM modelu byly určeny všechny známé krystalové struktury, což dokazuje, že se jedná o opravdu velmi dobrou aproximaci. Tato skutečnost se dá vysvětlit například srovnáním hodnot elektronových hustot⁵: maxima elektronové hustoty pro atomy z první řádky periodické soustavy jsou řádově $1000 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$, zatímco změny elektronové hustoty v důsledku vazby atomů jsou řádově $1 \text{ e}\cdot\text{\AA}^{-3}$, což je číslo o tři řády menší. IAM model tedy správně popisuje drtivou většinu elektronové hustoty v krystalu, která je sféricky rozmístěna v okolí atomových jader.

Při upřesňování struktury (kapitola 2.) poskytne IAM model informaci o polohách a teplotních parametrech atomů v krystalu (obr. 1a). Atomy se nacházejí v maximech elektronové hustoty (obr. 1b).

3.2. Nedostatky modelu nezávislých atomů

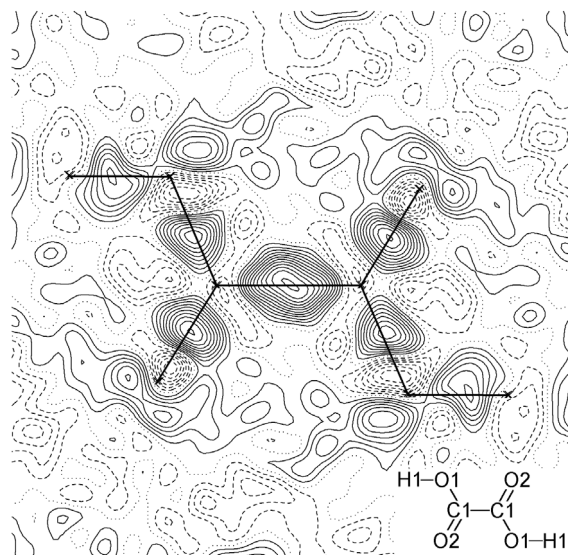
Aproximace použitá v IAM modelu funguje tím hůře, čím méně má atom elektronů. Krajním případem je atom vodíku s jediným elektronem. Pokud je vodík vázán kovalentní vazbou X-H (kde X = C, N, O), je jeho jediný elektron posunut směrem k atomu X. IAM model předpokládá, že elektronová hustota na atomu je sféricky symetrická a v maximum elektronové hustoty se nachází jádro atomu. Jelikož maximum elektronové hustoty pro atom vodíku je posunuto směrem k atomu X, při použití IAM nalezneme vodík v krystalové struktuře na nesprávném místě a výsledkem je efekt známý jako zdánlivé zkrácení X-H vazeb⁶, které se může pohybovat řádově až v desetinách Å.

Jiným efektem spojeným s nesférickým rozložením elektronové hustoty kolem atomů jsou asférické posuny. Efekt je poměrně jemný, ale stává se dobře patrným při porovnání rentgenografických a neutronografických dat. Neutrony difraktují na atomových jádrech, a tudíž neutronová difrakce poskytuje přesné polohy jader atomů. Rentgenové paprsky difraktují na elektronech, přičemž se v rámci IAM předpokládá, že v maximum elektronové hustoty se nachází jádro atomu, což však nemusí být vždy přesně splněno. Například v molekule vody je maximum elektronové hustoty pro atom kyslíku posunuto ve směru volného elektronového páru⁷. Asférické posuny jsou definovány jako rozdíly mezi neutronografickými a rentgenografickými polohami atomu a činí řádově tisíce až setiny Å. Pozorují se zejména u lehčích atomů, například pro atom kyslíku v -COOH skupině oxalové kyseliny⁸ nebo pro atom uhlíku v -CN skupině tetrakynoethylenu⁹.

Z dalších efektů, které odhalují některé nedostatky zjednodušeného modelu IAM, jmenujme ještě existenci dipólových momentů u molekul v krystalech¹⁰ a výskyt tzv. zakázaných difrakcí například u krystalů diamantu¹¹ nebo křemíku¹².

4. Deformační elektronové hustoty

Celkovou elektronovou hustotu v krystalu můžeme rozdělit na sférickou, tvořenou elektrony rozmístěnými sféricky v okolí jader, a nesférickou, tvořenou elektrony přeskupěnými v důsledku meziatomových interakcí. Na možnost přímého měření celkové elektronové hustoty v krystalech pomocí difrakce rentgenových paprsků upozornil již P. Debye v roce 1915, ale tehdejšími metodami byla nesférická část elektronové hustoty nedetegovatelná, protože představuje jen malou část celkové hustoty (kapitola 3.1.). Teprve v 60. a 70. letech umožnil rozvoj přístrojové a výpočetní techniky dostatečně přesné měření difrakčních dat a jejich přesnější a rychlejší zpracování na počítačích. Tehdy se začaly objevovat v zahraniční literatuře první práce zabývající se nesférickým rozložením elektronové hustoty kolem jader atomů. Většina prací byla založena na takzvaných deformačních elektronových hustotách. Mapy deformačních elektronových hustot ukazují odchylky (deformace) od sférického rozložení elektronů kolem atomových jader, tj. například kovalentní vazby nebo volné elektronové páry (obr. 2). Počítají se na základě vztahu známého ze standardní rentgenostrukturní analýzy:



Obr. 2. Výsledky X-X upřesňování dihydrátu oxalové kyseliny¹⁴; X-X mapa deformační elektronové hustoty v rovině molekuly oxalové kyseliny ukazuje kovalentní vazby a volné elektronové páry na atomech kyslíku, vrstevnice po 0,05 e.Å⁻³, kladné vrstevnice jsou plné, nulové vrstevnice tečkované a záporné vrstevnice přerušované čáry

$$\Delta\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (F_{hkl}^{\text{obs}} - F_{hkl}^{\text{calc}}) \exp[-2\pi i(hx + ky + lz)] \quad (7)$$

kde $\Delta\rho$ je diferenční nebo deformační elektronová hustota v místě daném frakčními souřadnicemi x, y, z , sumace probíhá přes všechny indexy h, k, l a V je objem základní buňky. F_{hkl}^{obs} jsou strukturální faktory, jejichž amplitudy jsou získané z experimentu (rovnice (1)) a fáze výpočtem. F_{hkl}^{calc} jsou strukturální faktory získané kompletně výpočtem (rovnice (4)). Při výpočtech se používají atomové rozptylové faktory izolovaných, sféricky symetrických atomů. Při standardní rentgenostrukturní analýze se při výpočtech F_{hkl}^{calc} používají jen parametry získané z nízkouhlových difrakčních dat. Mapa ukazuje píky odpovídající dosud nenalezeným atomům a nazývá se mapa diferenční elektronové hustoty. Pro získání mapy deformační elektronové hustoty, která ukazuje vazebné efekty, je třeba mít k dispozici vysokoúhlové difrakce. Dále jsou potřebné přesné polohy a teplotní faktory atomů neovlivněné vazebnými efekty, jako jsou například asférické posuny (kapitola 3.2.). Pokud se použijí k výpočtu F_{hkl}^{calc} polohy a teplotní parametry atomů získané z neutronové difrakce, jsou výsledkem X-N mapy deformační elektronové hustoty a metoda se nazývá X-N upřesňování. Neutronografická data však nejsou vždy k dispozici, a proto byla vyvinuta metoda založená čistě na rentgenografických datech, která se nazývá X-X upřesňování a poskytuje X-X mapy deformační elektronové hustoty (obr. 2). Při X-X upřesňování se hodnoty F_{hkl}^{calc} počítají pouze z parametrů určených z vysokoúhlových difrakcí. Vazebné efekty se týkají především valenčních elektronů, ale ty při vyšších difrakčních úhlech nedifraktují⁴. Vnitřní elektrony jsou vazebnými efekty ovlivněny jen nepatrně a navíc difraktují i při vyšších úhlech, takže lze s použitím vysokoúhlových difrakcí získat správnější polohy atomů.

X-X upřesňování se stalo úspěšnou metodou pro zobrazování elektronových hustot v krystalech. Používá se dodnes spolu s modernějšími postupy popsanými níže. Téma X-X a X-N deformačních elektronových hustot bylo již v české literatuře zpracováno v přehledném referátu¹³ a nebudeme se jím zde dále zabývat.

5. Určování atomových nábojů

Kappa upřesňování je upřesňování krystalové struktury metodou nejmenších čtverců na základě κ -formalismu¹, což je poměrně jednoduchý model, který umožňuje popsat přesun elektronové hustoty mezi atomy díky tomu, že odděluje difrakci na vnitřních a valenčních elektronech atomu. V rámci modelu jsou atomy v krystalu stále považovány za sféricky symetrické, ale mohou si navzájem vyměňovat elektrony a mohou měnit svoji velikost. Elektronová hustota atomu je popsána vztahem:

$$\rho_{\text{atom}}(r) = \rho_{\text{core}}(r) + P_v \kappa^3 \rho_{\text{valence}}(\kappa r) \quad (8)$$

kde funkce ρ_{core} je sféricky zprůměrovaná elektronová hustota příslušející vnitřním elektronům a ρ_{valence} je sféricky zprůměrovaná elektronová hustota příslušející valenčním elektronům atomu. Populační parametr valenční slupky P_v udává počet valenčních elektronů; atomové náboje je možno vypočítat jako $(N_v - P_v)$, kde N_v je počet valenčních elektronů v izolovaném atomu. Radiální parametr κ popisuje roztažení či smrštění valenční sféry atomu. Pokud platí $\kappa > 1$, stejná elektronová hustota jako u izolovaného atomu se nachází v menší vzdálenosti r od jádra, a tudíž je atom smrštěn ve srovnání s izolovaným atomem. Analogicky pro $\kappa < 1$ je atom roztažen, protože stejná elektronová hustota se nachází ve větší vzdálenosti r od jádra. Funkce ρ_{core} a ρ_{valence} jsou pro každý atom pevně definovány. Parametry P_v a κ se upřesňují spolu s polohovými a teplotními parametry atomů metodou nejmenších čtverců. Typickým výsledkem kappa upřesňování jsou právě hodnoty parametrů P_v a κ , které poskytují informace o atomových nábojích a roztažení či smrštění atomů v krystalu (tab. I).

Tabulka I

Výsledky kappa upřesňování krystalu dihydrátu kyseliny oxalové (obr. 1a). Atomové náboje q jsou vypočteny ze vztahu $(N_v - P_v)$, kde N_v je počet valenčních elektronů izolovaného atomu¹⁴

Atom	P_v [e]	κ	q [e]
C1	3,78 (2)	1,056 (3)	+0,22 (2)
O1	6,31 (1)	0,995 (2)	-0,31 (1)
O2	6,43 (1)	0,988 (2)	-0,43 (1)
O3	6,41 (2)	0,988 (2)	-0,41 (2)
H1	0,69 (1)	1,2 ^a	+0,31 (1)
H2	0,69 (1)	1,2 ^a	+0,31 (1)
H3	= H2 ^b	1,2 ^a	= H2 ^b

^a Parametry k všech vodíkových atomů byly fixovány, důvody viz^{1, 14}, ^b atomové náboje H2 a H3 byly v průběhu kappa upřesňování udržovány stejné

Výsledky kappa upřesňování oxalové kyseliny (obr. 1a) ukázané v tabulce I jsou v souladu s konceptem elektronegativity; například uhlíkový atom C1 nese kladný náboj, protože elektronovou hustotou mu odčerpaly dva elektronegativnější atomy kyslíku O1 a O2. V souladu s teoretickým předpokladem je též smrštění kladně nabitých atomů a roztažení atomů záporně nabitých. Znaménka atomových nábojů však nelze často odvodit pomocí takto jednoduchých postupů. Naopak, atomové náboje určené pomocí kappa upřesňování se často liší od nábojů předpovídaných například s použitím široce populárního oktového pravidla, a dokazují tak jeho omezenou platnost¹⁴.

6. Určování nábojových hustot

Termín nábojová hustota (charge density) se používá ve stejném významu jako termín elektronová hustota (electron density). V obou případech se jedná o rozmístění elektronů, přesněji řečeno hustoty elektronů či hustoty náboje v krystalu. Jediný rozdíl spočívá ve skutečnosti, že termínu elektronová hustota se častěji užívá v souvislosti s výše popsaným X-X upřesňováním, zatímco termínu nábojová hustota se častěji užívá v souvislosti s níže popsaným multipólovým upřesňováním.

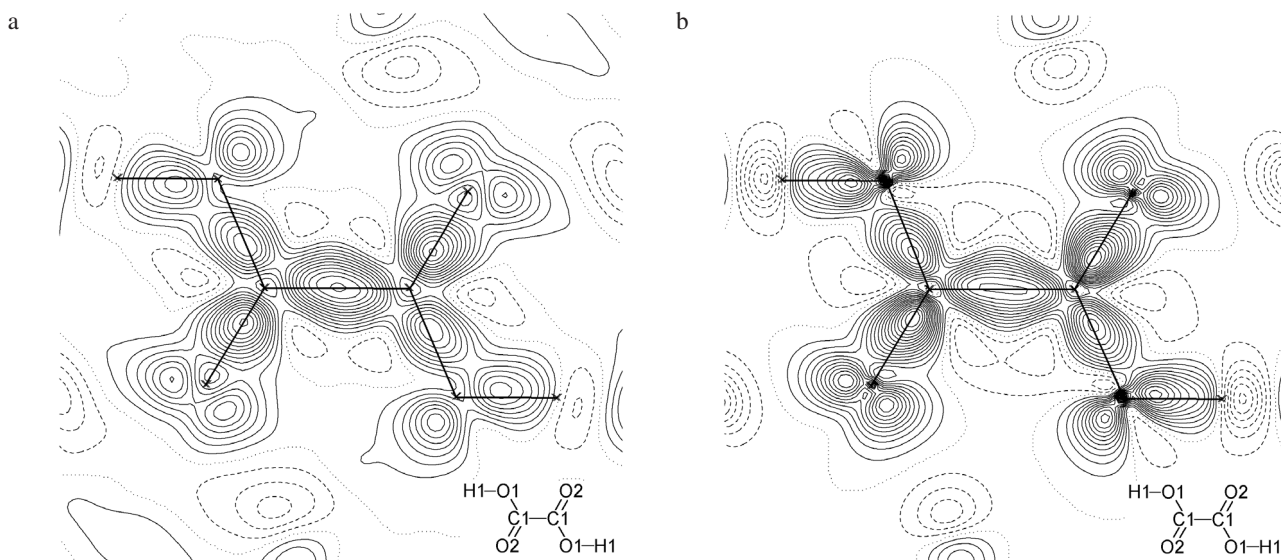
6.1. Multipólové upřesňování

Nesférickou elektronovou hustotu v krystalu je možno zviditelnit pomocí výše popsaného X-X upřesňování, ale maxima a minima na X-X mapách deformační elektronové hustoty nejsou nijak popsána. K popisu elektronové hustoty v krystalu je nutno použít pokročilejších modelů. V uplynulých 30 letech si největší popularitu získaly takzvané asférické pseudoatomové modely¹⁰. Po prvních teoretických studiích^{15,16} byly asférické pseudoatomové modely zavedeny do výpočetních programů pro rentgenostrukturní analýzu. Většina studií nábojových hustot v krystalech byla provedena programy LSEXP (cit.¹⁷), VALRAY (cit.¹⁸), POP (cit.¹⁹) a MOLLY (cit.²). Zřejmě nejpopulárnějším z těchto programů je MOLLY, který používá variantu asférického pseudoatomového modelu nazývanou multipólový model, založeného na multipólovém formalismu. Multipólový model byl později zaveden i do dvou moderních programů XD (cit.²⁰) a JANA2000 (cit.²¹).

Multipólové upřesňování je upřesňování krystalové struktury metodou nejmenších čtverců na základě multipólového formalismu². Předpokládá se, že atomy si mohou vyměňovat elektrony, a navíc mohou být nesférické. Elektronová hustota atomu je popsána vztahem:

$$\rho_{\text{atom}}(\mathbf{r}) = \rho_{\text{core}}(r) + P_v \kappa^3 \rho_{\text{valence}}(\kappa r) + \sum_{l=0}^{l_{\text{max}}} \kappa^l R_l(\kappa' r) \sum_{m=0}^l P_{lm\pm} d_{lm\pm}(\theta, \varphi) \quad (9)$$

kde vektor \mathbf{r} a souřadnice r , θ , φ jsou dány pomocí lokálního souřadnicového systému definovaného uživatelem na každém atomu. Celková elektronová hustota na atomu se získá sečtením tří členů. Význam prvních dvou členů je stejný jako v případě kappa upřesňování (rovnice (8)). Třetí člen, obsahu-



Obr. 3. Výsledky multipólového upřesňování dihydrátu oxalové kyseliny¹⁴; mapy nábojových hustot v rovině molekuly oxalové kyseliny ukazují kovalentní vazby a volné elektronové páry; a) mapa dynamické modelové deformační elektronové hustoty; b) mapa statické modelové deformační elektronové hustoty; vrstevnice jako na obr. 2

jící dvě sumace, mění atomovou elektronovou hustotu na nesférickou. R_l jsou radiální funkce Slaterova typu a $d_{lm\pm}$ jsou angulární funkce, nazývané též multipólové hustotní funkce nebo jen multipólové funkce či multipóly. Tvary radiálních a angulárních funkcí jsou pevně dány. Angulární funkce se tvarem velmi podobají atomovým orbitalům a jejich orientace v prostoru je definována lokálním souřadnicovým systémem na daném atomu. $P_{lm\pm}$ jsou multipólové populační parametry, udávající přesuny elektronů v rámci multipólových funkcí. Parametr κ' popisuje roztažení či smrštění nesférické elektronové hustoty popsané pomocí radiálních a angulárních funkcí.

Při multipólovém upřesňování se kromě polohových a teplotních parametrů atomů upřesňují metodou nejmenších čtverců ještě parametry P_v , κ , $P_{lm\pm}$ a κ' . Prostřednictvím těchto parametrů je popsána nábojová hustota v krystalu, čehož lze využít pro vykreslování modelových map deformačních elektronových hustot (obr. 3a, 3b). Modelové mapy jsou typickým výsledkem multipólového upřesňování. Název modelové vyplývá ze skutečnosti, že jsou založeny výhradně na parametrech získaných z multipólového modelu. Ve srovnání s X-X mapami vykazují modelové mapy deformačních elektronových hustot ostřejší píky a netrpí tolik experimentálním šumem (srovnej s obr. 2). Dynamická modelová mapa deformační elektronové hustoty se počítá v recipročním prostoru pomocí Fourierovy transformace. Mapa se nazývá dynamická, neboť zobrazuje elektronovou hustotu se zauvažováním teplotních pohybů atomů. Statická modelová mapa deformační elektronové hustoty se počítá v reálném prostoru přímým vykreslením modelové elektronové hustoty. Název statická plyne ze skutečnosti, že teplotní pohyby atomů jsou z výpočtu vypuštěny, a mapa tudíž ukazuje elektronovou hustotu v hypotetickém krystalu, v němž jsou všechny atomy v klidu. Přesný popis modelových map deformační elektronové hustoty lze nalézt v literatuře^{2,10}.

6.2. Další možnosti

První studia nábojových hustot byla prováděna na jednoduchých krystalech obsahujících lehké atomy, protože u nich jsou vazebné efekty nejsnáze pozorovatelné. Studia se omezovala na krystaly s centrosymetrickými prostorovými grupami kvůli přesnějšímu určení fází strukturálních faktorů. V současné době se díky využití plošných detektorů, moderních technik chlazení krystalů a synchrotronového záření studují i krystaly obsahující těžší atomy z první řady přechodných kovů²² a složitější krystaly s necentrosymetrickými prostorovými grupami²³. Díky rozvoji výpočetní techniky lze experimentální výsledky porovnávat s kvantově chemickými výpočty.

Moderní studie nábojových hustot v krystalech jsou založeny většinou na multipólovém modelu a modelových mapách deformačních elektronových hustot²⁴. Jedním z důvodů je skutečnost, že modelové mapy jsou narušeny od X-X map vhodně pro topologickou analýzu. Topologická analýza elektronové hustoty je podložena teorií AIM (Atoms In Molecules) (cit.²⁵) a pracuje jednak s celkovou elektronovou hustotou v krystalu ρ a jednak s laplaciánem elektronové hustoty $\nabla^2\rho$. Nejvýznamnějšími topologickými prvky jsou takzvané kritické body, v nichž jsou některé derivace elektronové hustoty nulové. Základními kritickými body jsou maxima elektronové hustoty na jádrech atomů, dalšími jsou například sedlové body kovalentních vazeb. Pomocí kritických bodů definuje topologická analýza další pojmy jako π -charakter vazby, eliptičita vazby apod., a umožňuje tak jednoznačně kvantifikovat a porovnávat různé typy meziatomových interakcí. Z výše uvedeného plyne, že v topologické analýze hrají klíčovou roli derivace elektronové hustoty. Z modelových elektronových hustot se derivace počítají snadno, neboť tyto mapy neobsahují tolik experimentálního šumu, který se v případě X-X elektronových hustot projeví jako zvlnění na mapách a následně jako falešné kritické body v topologické analýze (srovnej obr. 2, 3).

Ze známého rozložení elektronové hustoty v krystalu je možno počítat elektrostatické momenty, jako jsou monopólové, dipólové, kvadrupólové i vyšší momenty. Monopólové momenty jsou skalární veličiny odpovídající atomovým nábojům. První dipólový moment byl z rentgenostrukturních dat určen v roce 1970 Stewartem²⁶. Výsledky dosažené v oblasti experimentálního určování elektrostatických momentů do roku 1992 byly shrnuty Spackmanem²⁷.

Elektrostatický potenciál, který je rovněž možno určit na základě znalosti rozložení elektronové hustoty v krystalu, je definován jako energie potřebná k přenosu jednotkového kladného náboje z nekonečna do daného místa. Elektrostatický potenciál je důležitá veličina, která hraje roli při interakcích molekul a molekulárním rozpoznávání.

Molekuly v krystalové struktuře spolu navzájem interagují, takže je možno studovat vliv mezimolekulárních interakcí na rozložení elektronové hustoty v krystalu. Velmi důležitými mezimolekulovými interakcemi jsou vodíkové vazby, které byly studovány pomocí map nábojových hustot v řadě molekul¹⁰.

Multipólové parametry popisují jak nesférickou elektronovou hustotu na atomu, jako je například nesférické rozmístění elektronů v atomových orbitalech, tak sférickou elektronovou hustotu, která je lokalizována ve vazbách. V případě komplexů přechodných kovů je elektronová hustota ve vazbách kov–ligand zanedbatelná a většina elektronové hustoty je soustředěna v ne vazebných d-orbitalech. Při úplném zanedbání elektronové hustoty ve vazbách kov–ligand je možno odhadnout populace d-orbitalů centrálního atomu přímo na základě multipólových populačních parametrů $P_{lm\pm}$ získaných z multipólového upřesňování²⁸.

7. Shrnutí

Většina elektronové hustoty v krystalech je umístěna sféricky kolem jader atomů. Na tento fakt spoléhá standardní rentgenostrukturní analýza, která spočívá ve vyhledávání maxim elektronové hustoty v krystalu a přiřazování těchto maxim atomům. Typickým výsledkem standardní rentgenostrukturní analýzy monokrystalů je kompletní informace o polohách atomů v krystalu.

Z difrakčních dat je ovšem možno získat další informace týkající se rozložení elektronové hustoty v krystalu. Naměříme-li dostatečně kvalitní difrakční data, můžeme s úspěchem použít X-X upřesňování, kappa upřesňování nebo multipólové upřesňování. Metoda X-X upřesňování poskytuje mapy deformační elektronové hustoty, na nichž jsou vidět například kovalentní vazby a volné elektronové páry. Metoda kappa upřesňování poskytuje informace o atomových nábojích.

V současné době se pro přesná studia nábojových hustot nejvíce používá metody multipólového upřesňování. Tato metoda pomocí multipólových parametrů plně popisuje elektronovou hustotu v krystalu a poskytuje mapy modelových deformačních elektronových hustot, které jsou vhodné pro topologickou analýzu. Pomocí multipólových parametrů lze též určovat atomové náboje, dipólové a vyšší elektrostatické momenty, vykreslovat mapy elektrostatických potenciálů, určovat populace d-orbitalů přechodných kovů nebo studovat mezimolekulové interakce.

Studia nábojových hustot v krystalech jsou už ve světě

poměrně běžná. První studie se ve světě objevily v 60. a 70. letech. Přehled stavu problematiky v roce 1977 lze najít v literatuře²⁹. V roce 1978 vyšel základní článek pojednávající o multipólovém upřesňování² a v roce 1979 vyšel základní článek pojednávající o kappa upřesňování¹. V následujících letech se obor rychle rozvíjel a prací zabývajících se detaily rozložení elektronové hustoty v krystalech přibývalo díky zdokonalování přístrojové i výpočetní techniky. Koncem 90. let obor vyzrál, multipólový formalismus byl popsán v mezinárodních tabulkách pro krystalografii³⁰, objevily se první anglicky psané učebnice^{10,31} a přehledný referát shrnující stav tematiky na přelomu století²⁴.

V České republice se praktickým studiem nábojových hustot v krystalech dlouho nikdo nezabýval. V roce 1981 vyšla skripta⁵ a článek³² se stručným popisem problematiky, v roce 1985 vyšel v Chemických listech přehledný referát shrnující stav problematiky ve světě¹³. Zřejmě první studia atomových nábojů pomocí kappa upřesňování a nábojových hustot pomocí multipólového upřesňování se objevila v dizertační práci z roku 2001 (cit.¹⁴), která prokázala, že studium detailů rozložení elektronové hustoty v krystalech, ač experimentálně velmi náročné, je možné i v našich podmínkách.

LITERATURA

1. Coppens P., Guru Row T. N., Leung P., Stevens E. D., Becker P. J., Yang Y. W.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 35, 63 (1979).
2. Hansen N. K., Coppens P.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 34, 909 (1978).
3. Loub J.: *Krystalová struktura, symetrie a rentgenová difrakce*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1987.
4. Valvoda V., Polcarová M., Lukáč P.: *Základy strukturní analýzy*. Karolinum, Praha 1992.
5. Valvoda V., v knize: *Experimentální metody studia pevných látek. Rentgenová difrakce: struktury, nábojové hustoty, vazby* (Lukáč P., ed.), sv. 3. Matematicko-fyzikální fakulta UK, Praha 1981.
6. Hanson J. C., Sieker L. C., Jensen L. H.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 29, 797 (1973).
7. Taylor J. C., Sabine T. M.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 27, 134 (1972).
8. Coppens P., Sabine T. M., Delaplane R. G., Ibers J. A.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 25, 2451 (1969).
9. Becker P., Coppens P., Ross F. K.: *J. Am. Chem. Soc.* 95, 7604 (1973).
10. Coppens P.: *X-ray Charge Densities and Chemical Bonding*. Oxford University Press, New York 1997.
11. Nunes A. C.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 27, 219 (1971).
12. Trucano P., Batterman B. W.: *Phys. Rev. B* 6, 3659 (1972).
13. Loub J.: *Chem. Listy* 78, 720 (1984).
14. Šlouf M.: *Dizertační práce*. Univerzita Karlova, Praha 2001.
15. DeMarco J. J., Weis R. J.: *Phys. Rev. A* 137, 1869 (1965).
16. Dawson B.: *Proc. R. Soc. London, Ser. A* 297, 264 (1967).
17. Hirshfeld F. L.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 27, 769 (1971).
18. Stewart R. F.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 32, 565 (1976).
19. Epstein J., Ruble J. R., Craven B. M.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 38, 140 (1982).

20. Koritsanszky T., Howard S., Su Z., Mallinson P. R., Richter T., Hansen N. K.: *XD. Computer Program Package for Multipole Refinement and Analysis of Electron Densities from Diffraction Data*. Free University of Berlin, Berlin 1997.
21. Petříček V., Dušek M.: *JANA2000*. Fyzikální ústav AV ČR, Praha 2000.
22. Ptasiwicz-Bak H., Olovsson I., McIntyre G. J.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 55, 830 (1999).
23. Dahaoui S., Jelsch C., Howard J. A. K., Lecomte C.: *Acta Crystallogr., Sect. B* 55, 226 (1999).
24. Coppens P.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 54, 779 (1998).
25. Bader R. V. F.: *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. Clarendon Press, Oxford 1990.
26. Stewart R. F.: *J. Chem. Phys.* 53, 205 (1970).
27. Spackman M. A.: *Chem. Rev.* 92, 1769 (1992).
28. Holladay A., Leung P. C., Coppens P.: *Acta Crystallogr., Sect. A* 39, 377 (1983).
29. *Isr. J. Chem.* 1977, 16.
30. *International Tables for Crystallography* (Shmueli U., ed.), sv. B, str. 10. Kluwer, Dordrecht 1993.
31. Tsirelson V. G., Ozerov R. P.: *Electron Density and Bonding in Crystals*. Institute of Physics Publishing, Bristol 1996.
32. Valvoda V.: *Cs. Cas. Fyz. A* 31, 554 (1981).

Miroslav Šlouf (*Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Experimental Determination of Net Atomic Charges and Charge Density Distributions by means of Single Crystal X-ray Diffraction**

This article briefly reviews fundamentals of single crystal X-ray diffraction and describes two extensions of standard X-ray diffraction studies: kappa refinement and multipole refinement. Standard single-crystal X-ray diffraction study is based on conventional refinement, which yields positions and thermal displacement parameters of the atoms in the crystal. Kappa refinement gives additional information about net atomic charges. Multipole refinement provides information similar to kappa refinement and describes non-spherical charge density distribution around atom nuclei, which enables to visualise bonding features, such as covalent bonds and lone-pair orbitals. At the end of the article, elements and further possibilities of modern charge density studies are summarised.

Zavedená farmaceutická firma v americkém vlastnictví
hledá absolventa VŠ – organického chemika

do výzkumného oddělení v Praze.

Náplň práce: syntéza nových léčiv, vývoj syntetických metod a vývoj procesů. Dobrá znalost angličtiny podmínkou.
Nástup možný ihned. Žádosti s profesním životopisem zašlete na:
Interpharma Praha, a.s., Komořanská 955, 143 10 Praha 12
fax: 02/4025144, e-mail: interpharma@interpharma-praha.cz

STANOVENÍ TLAKŮ NASYCENÝCH PAR A VÝPARNÝCH TEPEL Z RETENČNÍCH ČASŮ V PLYNOVÉ CHROMATOGRAPHII

VÁCLAV SVOBODA^a a BOHUMÍR KOUTEK^{b,*}

^aÚstav fyzikální chemie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: koutek@uochb.cas.cz

Došlo dne: 27.XI.2000

Klíčová slova: plynová chromatografie, retenční časy, tlaky nasycených par, výparná tepla

Obsah

1. Úvod
2. Souhrn základních pojmů chromatografické separace
 - 2.1. Retenční charakteristiky
 - 2.2. Termodynamické charakteristiky
3. Přehled metod stanovení výparných tepel ($\Delta_{\text{vap}}H_m$) a tlaků nasycených par (p^0)
 - 3.1. Metoda odvozená ze semiteoretické rovnice
 - 3.2. Metody založené na relativní retenci
 - 3.2.1. Metoda využívající relativních retenčních časů (RRT)
 - 3.2.2. Metoda využívající Kovátsových retenčních indexů (KI)
 - 3.3. Metody empirické
4. Extrapolace dat
 - 4.1. Podchlazené kapaliny
 - 4.2. Standardní teploty
5. Odhad chyb chromatografického stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 při 298,15 K
 - 5.1. Chyba chromatografického stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$
 - 5.2. Chyba chromatografického stanovení p^0
6. Experimentální zařízení
7. Závěr

1. Úvod

V průběhu let se plynová chromatografie (GC) stala nejen jednou z nejrozšířenějších metod analytické chemie, ale prosadila se i jako metoda vhodná ke sledování dynamiky sorpčních, katalytických či difuzních procesů^{1–6} a jako důležitá metoda stanovení některých rovnovážných fyzikálně-chemických vlastností látek^{3,5,6}. Uplatnění plynové chromatografie ve fyzikální chemii vychází ze základních principů separačního procesu, založeného na rovnovážné distribuci látky mezi mobilní a stacionární fází v systému chromatografovaná lát-

ka–mobilní fáze–stacionární fáze. Tuto distribuci lze vyjádřit distribuční konstantou K_D , definovanou výrazem

$$K_D = \frac{c_s}{c_m} = \frac{n_s}{n_m} \frac{V_m}{V_s} \quad (1)$$

kde c označuje rovnovážnou koncentraci, n je látkové množství v příslušném objemu fáze V a indexy s a m odpovídají stacionární, respektive mobilní fázi.

Distribuční konstanta úzce souvisí s experimentálně dostupnými chromatografickými veličinami, retenčním objemem (V_R) či retenčním časem (t_R). Za určitých zjednodušujících předpokladů (viz dále) lze této skutečnosti využít ke stanovení výparných tepel ($\Delta_{\text{vap}}H_m$) a tlaků nasycených par (p^0) čistých látek, dvou veličin, které jsou spolu vázány jednoduchým exaktním vztahem, Clapeyronovou rovnicí.

V současné době existuje celá řada přímých (nechromatografických) experimentálních technik pro stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$ i p^0 . V případě výparných tepel je za nejpřesnější považována metoda kalorimetrická. Její neefektivnější využití je však omezeno na relativně úzký okruh těkavých látek, jejichž tlak se pohybuje v rozmezí 10 kPa < p^0 < 100 kPa při teplotách do 373 K. V případě stanovení tlaků nasycených par jsou pro oblast $p^0 < 1$ Pa považovány za nejpřesnější metoda nosného plynu („gas saturation method“) a metoda založená na efuzi („effusion method“). Pro uvedenou oblast tlaků jsou tyto metody doporučovány jak Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), tak Environmental Protection Agency⁷ (EPA). Obě metody však vyžadují mimořádnou pečlivost pro získání reprodukovatelných výsledků (malá kontaminace vzorků níže vroucími nečistotami nebo nekompletní odplynění způsobují výraznou chybu v měření) a obě jsou experimentálně a časově náročné.

V porovnání s klasickými metodami měření $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 , má plynová chromatografie obecně řadu předností. Mezi nejdůležitější přednosti patří: *a*) je vhodná pro látky, které nelze připravit ve větším množství nebo o požadované čistotě, včetně látek jedovatých a chemicky nestálých, *b*) je rychlá, *c*) jsou-li hodnoty retenčních časů dostatečně rozdílné, umožňuje měření řady látek najednou, *d*) umožňuje měření v širokém rozsahu přesně volitelných teplot a *e*) přístrojově je na trhu dobře zabezpečena velkým výběrem komerčních chromatografických metod má však i svá úskalí. K nim patří problémy spojené se získáním chemicky přesně definovaných stacionárních fází a zejména pak problémy související s korektním fyzikálním popisem interakce typu chromatografovaná látka (solut) – zakotvená fáze (solvent), navíc v systému, kde se mohou uplatnit i další typy rovnovážných interakcí.

V poslední době se podařilo řadu dílčích problémů vyřešit a celkově se zdá, že fyzikálně-chemické aplikace plynové chromatografie prožívají svoji renesanci. Jedním z hlavních

* Autor pro korespondenci

důvodů je pravděpodobně skutečnost, že látky, jejichž tlaky nasycených par při pokojové teplotě se pohybují v rozmezí 10^{-7} – 10^2 Pa, nabývají na stále větším významu jak v technologiích, tak při sledování kvality životního prostředí. Je to exponovaná oblast, která je v posledních letech středem zájmu široké veřejnosti. Uvedme jako příklad typické zdroje znečištění, které jsou spojeny s automobilovou dopravou a zemědělstvím. S rozvojem automobilového průmyslu narůstá význam alkenů (především iso-olefinů) ve výfukových plynech jakožto důsledek jejich zvýšeného podílu při výrobě nových typů oxidačních aditiv. V zemědělství roste význam látek, které se dostávají do ovzduší při aplikaci pesticidů (není bez zajímavosti, že současné normy vyžadují data o tlacích nasycených par jako součást žádosti o registraci každého nového pesticidního přípravku⁸) a podobně narůstá i význam látek používaných k ochraně rostlin před hmyzími škůdci v rámci systému tzv. integrované ochrany (semiochemikálie). Tyto přírodní látky (obvykle lineární či větvené alkoholy, acetyáty nebo aldehydy, převážně s jednou nebo dvěma dvojnými vazbami) sice nemají negativní dopad na životní prostředí, ale znalost jejich fyzikálně-chemických charakteristik při „pokojové“ teplotě (~ 25 °C) je nutná pro optimalizaci poměru komponent ve vícesložkových syntetických návnadách i pro modelování jejich transportu.

Je zřejmé, že klasické metody měření $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 nelze vzhledem k jejich experimentální a časové náročnosti aplikovat na velké soubory lineárních, větvených i cyklických olefinů, insekticidů, rodenticidů, fungicidů či semiochemikálií. Chromatografické stanovení těchto veličin je nepochybně racionálním řešením problému, a je mu proto po zásluze v poslední době věnována zvýšená pozornost.

Tato studie se věnuje současným možnostem stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 čistých látek z retenčních dat plynové chromatografie, hodnocení jednotlivých metod a poskytuje základní přehled zejména nových literárních zdrojů. Svým zaměřením studie navazuje na starší práce^{9,10} publikované v tomto časopise.

2. Souhrn základních pojmů chromatografické separace

Pro podrobné odvození vztahů a odpovídající teoretickou diskusi odkazujeme na původní literaturu^{1–6}. Cílem této části je pouze stručné shrnutí základních definic a důležitých vztahů mezi retenčními a termodynamickými veličinami, které mají usnadnit orientaci čtenáře v textu dalších kapitol. S ohledem na rozsah tématu se omezíme na situace, kde *a*) v chromatografickém systému je dosaženo rovnováhy, *b*) neuplatňují se minoritní adsorpční mechanismy retence, *c*) jedná se o eluční chromatografii při efektivně nekonečném zředění solutu (platí Henryho zákon) a *d*) chování nosného plynu i par analyzované látky lze popsat stavovou rovnicí ideálního plynu.

2.1. Retenční charakteristiky

Retenční charakteristiky v plynové chromatografii můžeme formálně rozdělit do dvou kategorií – na kategorii veličin absolutních a kategorii veličin relativních. Do první kategorie patří veličiny odvozené z (celkového) retenčního času t_R a (celkového) retenčního objemu V_R . Vztah mezi nimi je dán výrazem

$$V_R = F_c t_R \quad (2)$$

kde F_c je objemový průtok mobilní fáze měřený při teplotě kolony nebo na tuto teplotu korigovaný. Pro retenční čas i retenční objem dále platí

$$t_R = t_M + t_R^* \quad (3)$$

$$V_R = V_M + V_R^* \quad (4)$$

kde veličiny t_R^* a V_R^* označujeme jako adjustovaný retenční čas a adjustovaný retenční objem, t_M je tzv. mrtvý retenční čas (retenční čas látky neinteragující se stacionární fází) a V_M ($V_M = F_c t_M$) je mrtvý retenční objem.

Vzhledem k expanzi plynů při průchodu kolonou je objem nosného plynu potřebný k eluci inertní složky V_M , měřený na výstupu z kolony, větší než volný objem kolony V_m . Proto byl zaveden korekční faktor *j* (Jamesův-Martinův faktor) definovaný vztahem

$$j = \frac{2(p_i/p_0)^2 - 1}{3(p_i/p_0)^3 - 1} \quad (5)$$

kde p_i a p_0 jsou tlaky na vstupu a výstupu chromatografické kolony.

Pro tzv. korigovaný retenční objem V_R^0 a korigovaný mrtvý objem V_M^0 pak platí

$$V_R^0 = jV_R = jF_c t_R \quad (6)$$

$$V_M^0 = jV_M = jF_c t_M \quad (7)$$

Provedeme-li korekci adjustovaného retenčního objemu V_R^0 , získáme tzv. čistý (net) retenční objem V_N

$$V_N = jV_R^0 = F_c j t_R^* = K_D V_S \quad (8)$$

ktej je přímo závislý na distribuční konstantě a vztažením V_N na 1 g stacionární fáze a na 0 °C získáme vztah pro specifický retenční objem ve tvaru

$$V_g^0 = \frac{273,15 V_N}{T_c w_s} \quad (9)$$

kde w_s je hmotnost stacionární fáze v gramech a T_c je teplota kolony v K.

Vzhledem k tomu, že specifický retenční objem V_g^0 zahrnuje korekce na průtok nosného plynu, tlakový spád v koloně, teplotu a množství stacionární fáze, a je tedy přesně definovanou veličinou, má právě V_g^0 velký význam při určování termodynamických dat z plynové chromatografických měření. Chyba v experimentálním stanovení jednotlivých korekčních faktorů však pochopitelně zatěžuje chybou i hodnotu V_g^0 jako absolutní retenční charakteristiky. Proto jsou v praxi mnohem častěji využívány relativní retenční charakteristiky, které jsou vztahovány buď na retenci jediné standardní látky, nebo na retenci členů homologické řady standardních látek (retenční indexy). Relativní retenční charakteristiky jsou (za stejných

chromatografických podmínek) pouze funkcí distribučních konstant analyzované látky (analytu) a standardu.

2.2. Termodynamické charakteristiky

Použití malého množství vzorků a silně zředěných roztoků v plynové chromatografii dovoluje s dobrou aproximací aplikovat Henryho zákon, podle kterého je parciální tlak p_i rozpuštěné látky přímo úměrný molárnímu zlomku x . Pak

$$p_i = Kx = \gamma^\infty p^0 x \quad (10)$$

kde p^0 je tlak nasycených par čisté látky při teplotě systému a tlaku 101,325 kPa a γ^∞ je aktivitní koeficient při nekonečném zředění (platí, že aktivitní koeficient závisí na koncentraci; pro zředěné roztoky je roven konstantě a pro ideální roztoky je roven jedné).

Využitím Daltonova zákona pro vyjádření celkového tlaku p a stavové rovnice pro složku v plynné fázi dostáváme po dosazení do rovnice (1) upravený výraz pro distribuční konstantu

$$K_D = \frac{p}{\gamma^\infty p^0} \frac{n_s}{n_m} = \frac{RT}{\gamma^\infty p^0} \frac{n_s}{V_s} \quad (11)$$

a kombinací rovnice (11) s rovnicemi (8) a (9) získáváme po standardních úpravách důležitý výraz pro V_g^0

$$V_g^0 = \frac{273,15 R}{\gamma^\infty p^0 M} \quad (12)$$

kde M označuje molární hmotnost stacionární fáze.

Podle rovnice (12) ovlivňují retenci chromatografované látky pouze dvě, tuto látku charakterizující vlastnosti, γ^∞ a p^0 . Významným rysem rovnice (12) je rovněž skutečnost, že všechny tři veličiny (V_g^0 , γ^∞ a p^0) jsou závislé pouze na teplotě.

Závislost tlaku nasycených par na teplotě vyplývá z Clausiovy-Clapeyronovy rovnice

$$\frac{d \ln p^0}{dT} = \frac{\Delta_{\text{vap}} H_m}{RT^2} \quad (13)$$

Aktivitní koeficient solutu γ^∞ v roztoku stacionární kapaliny souvisí s molární dodatkovou směšovací Gibbsovou energií $\Delta_E G_m$ vztahem

$$\ln \gamma^\infty = \frac{\Delta_E G_m}{RT} = \frac{\Delta_E H_m}{RT} - \frac{\Delta_E S_m}{R} = \ln \gamma_t^\infty + \ln \gamma_a^\infty \quad (14)$$

kde $\Delta_E H_m$ je molární dodatková směšovací entalpie, $\Delta_E S_m$ je molární dodatková směšovací entropie. Veličiny γ_t^∞ a γ_a^∞ označují termickou (entalpickou) a atermickou (entropickou) složku aktivitního koeficientu a jsou definovány rovnicemi

$$\gamma_t^\infty = \exp[\Delta_E H_m / RT] \quad (15)$$

$$\gamma_a^\infty = \exp[-\Delta_E S_m / R] \quad (16)$$

Entalpická složka, která je obvykle dominující, může být vyjádřena vztahem¹¹

$$\ln \gamma_t^\infty = \frac{v}{RT} (\delta - \delta_s)^2 \quad (17)$$

kde v je molární objem solutu a δ a δ_s jsou tzv. rozpustnostní parametry solutu a stacionární fáze. Jejich stanovení podrobně popisuje např. Barton¹².

Entropická složka závisí podle Floryho-Hugginsovy teorie¹³ na rozdílu molárních objemů solutu (v) a stacionární fáze (v_s):

$$\ln \gamma_a^\infty = 1 - \frac{v}{v_s} - \ln \frac{v}{v_s} \quad (18)$$

Závislost aktivitního koeficientu na teplotě je dána vztahem

$$\frac{d \ln \gamma^\infty}{dT} = -\frac{\Delta_E H_m}{RT^2} \quad (19)$$

Logaritmováním rovnice (12) a dosazením za $\ln p^0$ a $\ln \gamma^\infty$ z integrovaných rovnic (13) a (19) dostáváme

$$\ln V_g^0 = \frac{\Delta_{\text{vap}} H_m - \Delta_E H_m}{RT} + \text{konst} = \frac{\Delta_s H_m}{RT} + \text{konst} \quad (20)$$

kde $\Delta_s H_m$ je parciální molární výparné teplo složky z kapalné stacionární fáze, které je až na znaménko rovné molárnímu rozpouštěcímu teplu $\Delta_{\text{sol}} H_m$. Platí tedy

$$\Delta_{\text{vap}} H_m - \Delta_E H_m = \Delta_s H_m = -\Delta_{\text{sol}} H_m \quad (21)$$

V závěru této kapitoly připomeňme, že pokud jde o limitující podmínky *a*), *c*) a *d*) uvedené v úvodu, lze je většinou bez velkých obtíží splnit dávkováním malých množství studovaných látek a dodržením běžných chromatografických pravidel. Pokud jde o adsorpční efekty, máme dvě možnosti: *a*) volíme takové podmínky, o kterých je ze zkušenosti známo, že uplatnění adsorpčních mechanismů eliminují, či alespoň silně minimalizují (tzn. vyloučíme analýzu polárních látek na nepolárních fázích), nebo *b*) využijeme rozšířeného tvaru rovnice (8) ve formě $V_N = K_D V_S + K_1 A_1$, kde K_1 představuje poměr koncentrace látky adsorbované ke koncentraci látky v plynné fázi a A_1 je povrch kapalné fáze na gram náplně. Rozšířená rovnice umožňuje vyhodnotit obě distribuční konstanty^{5,14,15} a zjistit podíl adsorpce na retenci.

3. Přehled metod stanovení výparných tepel a tlaků nasycených par

3.1. Metoda založená na semiteoretické rovnici

Na základě podobnosti mezi separačními procesy v destilační a chromatografické koloně odvodili Hoare a Purnell¹⁶ vztah pro V_g^0 ve tvaru:

$$\ln V_g^0 = -a \ln p^0 + \ln \frac{273,15R}{\gamma_a^\infty M} + 2,303C (a - 1) \quad (22)$$

kde $a = \Delta_s H_m / \Delta_{\text{vap}} H_m$ a C je konstanta.
Úprava rovnice (22) pomocí vztahu

$$2,303a \log p^0 = \frac{a \Delta_{\text{vap}} H_m}{RT} + aC \quad (23)$$

vede k výrazu

$$\log V_g^0 = \frac{a \Delta_{\text{vap}} H_m}{2,303RT} + \log \frac{273,15R}{\gamma_a^\infty M} - C' \quad (24)$$

a (s ohledem na definice a a γ_a^∞) k rovnici (25), která je totožná s rovnicí (20).

$$\log V_g^0 = \frac{\Delta_s H_m}{2,303RT} + C' \quad (25)$$

kde C' označuje obecnou konstantu.

Za předpokladu konstantního průtoku nosného plynu chromatografickou kolonou pro měřenou sérii látek je možné nahradit ve výše uvedených rovnicích specifický retenční objem lépe experimentálně dostupnou veličinou, adjustovaným retenčním časem t'_R . Rovnice (25) pak přechází na

$$\log t'_R = \frac{\Delta_s H_m}{2,303RT} + C' \quad (26)$$

respektive

$$\log \frac{1}{t'_R} = -\frac{\Delta_s H_m}{2,303RT} + C' = \frac{\Delta_{\text{sol}} H_m}{2,303RT} + C' \quad (27)$$

Význam rovnice (27) značně stoupl po empirickém zjištění Chickose¹⁷, že pro skupiny chemicky blízkých látek je závislost solvatačního tepla na výparném teple lineární. Z lineární závislosti $\ln(1/t'_R) = f(1/T)$ lze tedy nejprve stanovit solvatační tepla, a ta pak korelovat s odpovídajícími výparnými tepley standardních látek, která byla stanovena jinou, např. kalorimetrickou metodou. Výparné teplo studované látky pak pro změřenou hodnotu $\Delta_{\text{sol}} H_m$ odečteme z grafu. Podmínkou však je, aby pro studovanou látku bylo $\Delta_{\text{sol}} H_m$ stanoveno stejným způsobem a za stejných podmínek, jako tomu bylo u látek standardních. Ideální je, když rozdílné hodnoty retenčních časů umožňují vytvořit směs standardních látek s látkami měřenými a provést chromatografická měření najednou. Tento postup byl v poslední době široce uplatněn řadou autorů¹⁷⁻²¹ pro stanovení výparných tepel alkenů, cykloalkenů, lineárních i větvených uhlovodíků, polyetherů a polychlorovaných bifenylů. Metoda neaspirovala na stanovení tlaků nasycených par.

3.2. Metody založené

na relativní retenci

Druhá skupina metod je založena na relativních vztazích platných pro studované a zvolené standardní látky. Z rovnice (8) vyplývá, že pro relativní eluční charakteristiky dvou látek analyzovaných za stejných chromatografických podmínek jednoznačně platí

$$V_{N,1}/V_{N,2} = V_{R,1}^2/V_{R,2}^2 = V_{g,1}^0/V_{g,2}^0 = K_{D,1}/K_{D,2} = t'_{R,1}/t'_{R,2} \quad (28)$$

Velkou výhodou relativních retenčních charakteristik je nízká pravděpodobnost, že jejich stanovení bude zatíženo významnou experimentální chybou. Měření relativní retence eliminuje vliv možných rozdílů v rychlosti mobilní fáze, hmotnosti či objemu stacionární fáze, délky kolony apod. Z možností, které pro vyjádření relativních veličin nabízí rovnice (28), se v dalším textu omezíme na úvahy o adjustovaných retenčních časech.

3.2.1. Metoda využívající relativních retenčních časů (RRT)

Rozepíšeme-li rovnici (12) v logaritmickém tvaru pro dvě látky, látku měřenou (index 1), a látku standardní (index 2), platí, s ohledem na rovnici (28), vztah

$$\ln(t'_{R,2}/t'_{R,1}) = \ln(p_1^0/p_2^0) + \ln(\gamma_1^\infty/\gamma_2^\infty) \quad (29)$$

který zavedl do chromatografie Herington²². Pro separaci nepolárních látek na nepolární stacionární fázi lze v první aproximaci předpokládat, že $\gamma_1^\infty \cong \gamma_2^\infty$, a pak

$$\ln(t'_{R,2}/t'_{R,1}) = \ln(p_1^0/p_2^0) \quad (30)$$

Využití rovnice (30) pro stanovení tlaků nasycených par a výparných tepel dále rozpracoval Hamilton²³. Vychází z předpokladu, že pro fázovou rovnováhu platí Clausiova-Clapeyronova rovnice (13) a poměr výparných tepel měřené a standardní látky lze v nepříliš širokém teplotním intervalu považovat za konstantní. Pro látky 1 a 2 chromatografované při stejné teplotě pak můžeme psát

$$\ln p_1^0 = (\Delta_{\text{vap}} H_{m,1}/\Delta_{\text{vap}} H_{m,2}) \ln p_2^0 + C \quad (31)$$

kde C je integrační konstanta.

Kombinace rovnic (30) a (31) vede k výrazu

$$\ln \frac{t'_{R,1}}{t'_{R,2}} = \left[1 - \frac{\Delta_{\text{vap}} H_{m,1}}{\Delta_{\text{vap}} H_{m,2}} \right] \ln p_2^0 - C \quad (32)$$

který umožňuje výpočet tlaku nasycených par látky 1 tak, že nejprve korelací $\ln(t'_{R,1}/t'_{R,2})$ proti známým tlakům nasycených par standardu 2 při několika teplotách, totožných s teplotou

tami chromatografických měření, získáme hodnoty směrnice $(1 - \Delta_{\text{vap}} H_{m,1} / \Delta_{\text{vap}} H_{m,2})$ a úseku C. Tyto hodnoty dosadíme do rovnice (31) a známe-li p_2^0 a $\Delta_{\text{vap}} H_{m,2}$ při požadované teplotě, můžeme vypočítat jak údaje o tlaku nasycených par při této teplotě, tak i hodnoty výparných tepel.

Tato metoda je v současné době pravděpodobně nejjednodušší metodou pro stanovení tlaků nasycených par a výparných tepel. Vcelku úspěšně byla aplikována na stanovení těchto veličin např. pro série aromátů a chlorovaných bifenylů²⁴, substituovaných bipyridinů²⁵, chlorovaných fenolů²⁶, alkylbenzenů²⁷, nenasycených alkoholů²⁸, aldehydů²⁹ a acetatů³⁰ i dalších látek³¹.

3.2.2. Metoda využívající Kovátsových indexů (KI)

Nevýhodou metody, která využívá pouze jednu standardní látku, je, že nelze najít jednotný standard, který by vyhovoval všem typům analyzovaných látek. K překonání této nevýhody byly Kovátsem³² navrženy retenční indexy I , které lze alternativně k rovnici (29) definovat pomocí vztahu

$$I_X = 100z + 100 \frac{\log t_{R,X}^* - \log t_{R,z}^*}{\log t_{R,z+1}^* - \log t_{R,z}^*} =$$

$$= 100z + 100 \frac{\log(\gamma_z^\infty p_z^0 / \gamma_X^\infty p_X^0)}{\log(\gamma_z^\infty p_z^0 / \gamma_{z+1}^\infty p_{z+1}^0)} \quad (33)$$

kde veličiny indexované jako X, z a (z + 1) se vztahují k měřené látce X a zvoleným standardním alkanům s počtem uhlíkových atomů z a (z + 1). Alkany volíme tak, aby $t_{R,z}^* < t_{R,X}^* < t_{R,z+1}^*$. Retenční index, definovaný rovnicí (33), závisí na vlastnostech použité stacionární fáze a v menší míře i na teplotě. Vyjádřením p_X^0 z rovnice (33) dostáváme rovnici (34)

$$\log p_X^0 = \log(p_z^0 \gamma_z^\infty / \gamma_X^\infty) +$$

$$+ \frac{\log(p_z^0 \gamma_z^\infty / \log p_{z+1}^0 \gamma_{z+1}^\infty)}{100} (100z - I_X) \quad (34)$$

která se pro případ, že $\gamma_X^\infty = \gamma_z^\infty = \gamma_{z+1}^\infty$, redukuje na rovnici

$$\log p_X^0 = \log p_z^0 + \frac{\log p_z^0 - \log p_{z+1}^0}{100} (100z - I_X) \quad (35)$$

Ke stanovení tlaků nasycených par byla použita jak zjednodušená rovnice (35) (cit.³³), tak rovnice (34) v modifikované verzi s aproximací $\gamma_z^\infty = \gamma_{z+1}^\infty$ a s vyjádřením poměru aktivitních koeficientů $\gamma_z^\infty / \gamma_X^\infty$ pomocí McReynoldsových konstant modelových sloučenin^{34,35}.

Vztah pro výparné teplo korespondující s rovnicí (35) má tvar

$$\Delta_{\text{vap}} H_{m,X} = \Delta_{\text{vap}} H_m + \frac{\Delta_{\text{vap}} H_{m,z} - \Delta_{\text{vap}} H_{m,z+i}}{100} (100z - I_X) -$$

$$- \frac{2,303RT^2 (\log p_z^0 - \log p_{z+1}^0) (dI_X / dT)}{100} \quad (36)$$

který pro praktické použití vyžaduje znalost údajů o teplotní závislosti retenčního indexu. V literatuře jsou pro popis této závislosti používány jak lineární, tak hyperbolické i kvadratické funkce typu³⁶

$$I_X = A_0 + \frac{A_1}{T + A_2} \quad (37)$$

$$I_X = B_0 + B_1 T + B_2 T^2 \quad (38)$$

3.3. Metody empirické

Kromě výše uvedených metod, které vycházejí z teorie chromatografického děje a lze je do určité míry považovat za semiteoretické, existuje řada čistě empirických vztahů, které jsou užitečné zejména pro predikci sledovaných veličin v homologických seriích. K důležitějším korelacím tohoto typu patří vztah mezi tlakem nasycených par a retenčním indexem^{37,38}.

$$\ln p_X^0 = a + b I_X \quad (39)$$

kde a , b jsou parametry rovnice.

Zajímavou empirickou metodu pro stanovení tlaků nasycených par navrhl Donovan³⁹ (metoda D). Metoda je založena na měření chromatografických retenčních časů v teplotně programovaném režimu a využívá skutečnosti, že pro chemicky příbuzné látky lze sestavit graf závislosti $\ln p^0$ na $t_{R,X}^*$, v němž spojnicí bodů je přímka. Pomocí dvou standardů 1, 2 (standardů lze použít i více), jejichž tlak nasycených par při požadované teplotě je znám, se sestojí přímka. Z grafické závislosti odečteme pro příslušné $t_{R,X}^*$ hodnotu $\ln p_X^0$ nebo použijeme výpočetního postupu. Z elementární geometrie přímky v uvedených souřadnicích vyplývá vztah

$$\frac{\ln p_X^0 - \ln p_1^0}{t_{R,X}^* - t_{R,1}^*} = \frac{\ln p_2^0 - \ln p_1^0}{t_{R,2}^* - t_{R,1}^*} \quad (40)$$

a odtud úpravou

$$\ln p_X^0 = \left(t_{R,X}^* - t_{R,1}^* \right) \frac{\ln p_2^0 - \ln p_1^0}{t_{R,2}^* - t_{R,1}^*} + \ln p_1^0 \quad (41)$$

Volba standardů požaduje, aby $p_2^0 > p_X^0 > p_1^0$. Metoda je odvozena především pro výpočet hodnot tlaků nasycených par při zvolené teplotě.

4. Extrapolace dat

4.1. Podchlazené kapaliny

V případě tuhých látek, chromatografovaných při teplotách vyšších než jejich teplota tání, je třeba mít na paměti, že tlak nasycených par (a tím i $\Delta_{\text{vap}}H_m$) stanovený některou z výše uvedených metod extrapolací na 298,15 K (p_L^0) odpovídá hypotetickému stavu podchlazené kapaliny (subcooled liquid). K přepočtu na tlak nasycených par v tuhém stavu (p_X^0) slouží vztah

$$\frac{p_S^0}{p_L^0} = \exp[-\Delta_{\text{fus}}S_m(T_M/T - 1)/R] \quad (42)$$

kde $\Delta_{\text{fus}}S_m$ je entropie tání, T_M je teplota tání a T je zadaná teplota. Pro středně velké rigidní molekuly je pro $\Delta_{\text{fus}}S_m$ rozumnou aproximací⁴⁰ průměrná hodnota 56,5 J.K⁻¹.mol⁻¹. Pro některé skupiny látek však může $\Delta_{\text{fus}}S_m$ nabývat výrazně odlišných hodnot.

4.2. Standardní teploty

Požadavek teplotní extrapolace hodnot $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 vyplývá ze skutečnosti, že chromatografická měření probíhají většinou při teplotách 320–480 K. Pokud chceme znát tyto hodnoty při 298,15 K (teplota odpovídající obvyklé standardizaci fyzikálně-chemických dat a současně průměrná teplota odpovídající normám sledování kvality životního prostředí), pak je nutné provést extrapolace většího či menšího rozsahu. U chromatografických metod založených na relativní retenci je obvykle nutné extrapolovat i hodnoty pro standardní látky.

V případě výparných tepel jsou přesné kalorimetrické údaje pro 298,15 K k dispozici pro řadu látek, kromě toho existují poměrně kvalitní příspěvkové metody umožňující kvalifikovaný odhad a konečně je možné přepočítat hodnotu výparného tepla z teploty dané na teplotu standardní pomocí zjednodušeného tvaru Planckovy rovnice⁴¹

$$\Delta_{\text{vap}}H_m(T_2) = \Delta_{\text{vap}}H_m(T_1) + \int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \quad (43)$$

kde ΔC_p označuje rozdíl molárních tepelných kapacit v plynném a kapalném stavu. Při praktickém použití rovnice (43) můžeme očekávat, že oba údaje o tepelných kapacitách jako funkcích teploty budou přístupné jen ojedinele a zpravidla budeme odkázáni na výpočet průměrných hodnot použitím některé ze strukturálně příspěvkových metod.

V případě tlaků nasycených par je situace méně příznivá. Obecně platí, že většina rovnic doporučovaných pro popis závislosti $\ln p^0 = f(T)$ je čtyř- a víceparametrová^{42,43} (Wagnerova rovnice, Coxova rovnice, Čebyševův polynom apod.) a pro vyhodnocení parametrů je zapotřebí relativně velkého množství experimentálních údajů. Z výše uvedených chromatografických metod nabízí nejjednodušší řešení metoda založená na relativních retenčních časech (RRT). Předpokládá totiž, že hodnota směrnice základní rovnice (31) se v nepřilíh širokém extrapolačním okolí nemění (zejména pro strukturálně podobné látky), a pak extrapolace hodnot jak pro tlaky, tak i výparná tepla nečiní potíže. Metoda ovšem vyžaduje znalost hodnot tlaku i výparného tepla standardní látky pro 298,15 K.

5. Odhad chyb chromatografického stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 při 298,15 K

Vzhledem k tomu, že výše popsané chromatografické metody jsou obecně metody nepřímé, vyhodnocení jejich chyby je spojeno s určitými obtížemi. Celkovou chybu δ_{tot} jakékoliv fyzikální veličiny Q můžeme v takovém případě teoreticky definovat⁴⁴ výrazem

$$\delta_{\text{tot}} = \sqrt{\delta_m^2 + \sum \delta_{d,i}^2} \quad (44)$$

kde δ_m je chyba metody (odrážející zahrnuté aproximace) a δ_d představuje doplňkovou (propagated) chybu, která odráží nepřesnosti v sekundárních datech vstupujících do modelu (výběr standardu a přesnost údajů, které jsou pro tento standard k dispozici, přesnost případně použitých teplotních extrapolací, fázových korekcí apod). Poněvadž δ_d je z literárních údajů obvykle nemožné vyhodnotit, omezíme se v další diskusi na chybu relativní δ . Je definována vztahem

$$\delta[\%] = 100(Q_{\text{GC}} - Q_{\text{ref}})/Q_{\text{ref}} \quad (45)$$

a představuje rozdíl mezi hodnotami Q stanovenými chromatograficky (Q_{GC}) a hodnotami získanými z nezávislých (nechromatografických) měření (Q_{ref}). Ani v tomto případě se však nevyhneme jistým obtížím. Zatímco přesné kalorimetrické hodnoty výparných tepel ($Q = \Delta_{\text{vap}}H_m$) při 298,15 K jsou přístupné pro řadu látek a kromě toho (s ohledem na aditivní charakter této veličiny) existují i kvalitní příspěvkové metody pro jejich odhad, jsou přesné hodnoty tlaků nasycených par ($Q = p^0$) při této teplotě známé kromě alkanů jen pro velmi omezený okruh látek. Situaci komplikuje i skutečnost, že výsledky měření p^0 nechromatografickými metodami vykazují poměrně značný rozptyl (viz dále) mezi jednotlivými (i renomovanými) laboratořemi. Z uvedených důvodů budou odhady chyb stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$ a p^0 při 25 °C diskutovány odděleně; navíc je třeba zdůraznit, že tyto odhady jsou „kvalitativní“ v tom smyslu, že jsou ovlivňovány kvalitou vstupních dat pro zvolené standardy, která může být značně odlišná pro jednotlivé zkoumané série látek.

5.1. Chyba chromatografického stanovení $\Delta_{\text{vap}}H_m$

Peacock a Fuchs⁴⁵ testovali přesnost metody odvozené ze semiteoretické rovnice s využitím adjustovaného retenčního času v kombinaci s kalorimetrickým stanovením $\Delta_E H_m$. Pro skupinu 13 větvených derivátů uhlovodíků našli, že rozdíl mezi chromatografickými a literárními údaji o výparném teple činí kolem 0,5 %, pro dvanáct methylesterů a pro dalších sedmáct esterů se rozdíl pohyboval v rozmezí 1–2 %. Chicokos⁴⁶ testoval chybu metody s adjustovaným retenčním časem a srovnávacím grafem mezi $\Delta_{\text{sol}}H_m$ a $\Delta_{\text{vap}}H_m$. Testovaná skupina zahrnovala 102 uhlovodíků a jejich derivátů, obsahujících jednu funkční skupinu. Pro uhlovodíky nepřesáhla chyba 0,5 % a pro většinu derivátů 1 %. Pouze pro 19 látek z uvedeného souboru byla nalezena chyba větší než 3 % a pro 5 látek přesáhla chyba 5 %. Podobně použití metody RRT ved-

Tabulka I

Ilustrativní hodnoty tlaků nasycených par vybraných chemikálií při 298,15 K stanovené přímým měřením

Sloučenina	p^0 [Pa]	
	hodnota (metoda ^a)	doporučená či průměrná hodnota z E a GS \pm SD ^b
Bifenyl	0,58 (E,Kn); 1,43 (E,Kn,i); 1,29 (E); 1,19 (GS); 1,34 (GS)	1,130 \pm 0,31 (6)
<i>p,p'</i> -DDT	4,52 \cdot 10 ⁻⁵ (E, T); 5,56 \cdot 10 ⁻⁵ (GS); 5,80 \cdot 10 ⁻⁵ (GS); 1,17 \cdot 10 ⁻³ (GS)	2,38 \cdot 10 ⁻⁴ \pm 4,56 \cdot 10 ⁻⁴ (6)
di- <i>n</i> -Butylftalát	3,17 \cdot 10 ⁻³ (E); 3,45 \cdot 10 ⁻³ (E, Kn,i); 4,03 \cdot 10 ⁻³ (GS); 9,7 \cdot 10 ⁻³ (GS)	7,57 \cdot 10 ⁻³ \pm 10,15 \cdot 10 ⁻³ (8)

^a E = efuze, v uspořádání Kn = Knudsenova cela, Kn,i = Knudsenova cela („internal balance“), T = torzní, GS = metoda nosného plynu („gas saturation“), ^b SD = směrodatná odchylka, v závorce celkový počet stanovení

Tabulka II

Průměrná absolutní chyba chromatografického stanovení tlaků nasycených par δ_{Φ} podle funkčních skupin v homologických sériích H-(CH₂)_n-Y

Série	Počet látek	δ_{Φ} [%]				
		RRT ^a	KI1 ^b	KI2 ^c	KI3 ^d	D ^e
Y=Cl	9	6,5	10,9	14,0	5,2	19,6
Y=Br	8	12,0	8,5	7,2	12,5	15,3
Y=CHO	6	5,1	19,0	13,9	12,0	56,2
Y=COOCH ₃	8	8,1	11,2	19,0	9,9	20,6
Y=OCOCH ₃	9	12,9	11,9	31,2	13,1	20,8
<i>Celkem</i>	40	9,2	11,9	17,5	10,4	24,7

^a Metoda relativních retenčních časů ($\gamma_1^{\infty} \equiv \gamma_2^{\infty}$); ^b metoda založená na měření Kovátsových retenčních indexů ($\gamma_X^{\infty} = \gamma_Z^{\infty} = \gamma_{Z+1}^{\infty}$); ^c metoda založená na měření Kovátsových retenčních indexů ($\gamma_Z^{\infty} = \gamma_{Z+1}^{\infty}$; γ_X^{∞} , aproximováno z McReynoldsových konstant modelových sloučenin), lineární závislost $I = f(T)$; ^d stejně jako předchozí, ale kvadratická závislost $I = f(T)$; ^e empirická metoda Donovanova, alkanly jako standard

lo k chybě $\leq 1,1$ % pro sérii acetatů³⁰ a velmi dobré výsledky ($\delta \leq 0,53$ %) poskytla metoda založená na měření Kovátsových indexů (rovnice (36)) pro sérii methylesterů mastných kyselin³⁵. Zajímavá studie, dokumentující důležitost znalosti přesných hodnot $\Delta_{\text{vap}}H_m$ při 298,15 K pro standard byla publikována nedávno²¹. Pro sérii 16 polychlorovaných bifenyly byly porovnány hodnoty výparných tepel stanovených Chirkosovou modifikací semiteoretické metody se staršími daty získanými metodou RRT, ovšem s využitím novějších údajů pro $\Delta_{\text{vap}}H_m$ standardů. Průměrná odchylka mezi oběma metodami se výrazně zlepšila z původních 8,6 % na 3,4 %, což lze považovat za velmi dobrou shodu.

5.2. Chyba chromatografického stanovení p^0

Jak již bylo uvedeno v úvodu, za nejpřesnější metody přímého (nechromatografického) měření tlaků nasycených par jsou pro oblast $p^0 < 1$ Pa považovány metoda nosného

plynu (GS) a metoda založená na efuzi (E). Pro vyhodnocení relativní chyby chromatografických metod jsme tedy odkázali jak v případě p_{ref}^0 (26), tak v případě standardů pro relativní retenci (rovnice (31), (32), (34), (35) a (41)) na hodnoty poskytované těmito metodami. Pro ilustraci přesnosti GS a E metody uvádíme v tabulce I literární údaje (převzaté z nedávných kompilací^{7,47}) pro tři běžné chemikálie, tj. bifenyly, *p,p'*-DDT a di-*n*-butylftalát, které jsou poměrně často využívány jako standardy při chromatografickém stanovení tlaků nasycených par kontaminantů ovzduší.

Značný rozptyl hodnot naměřených pro jednotlivé sloučeniny doporučenými metodami vede k závěru, že a) u všech metod založených na relativní retenci je nutno věnovat značnou pozornost výběru optimálního standardu, b) volba standardu chemicky co nejpodobnějšího měřené látky nemusí nutně znamenat výhodu, pokud pro tento standard není znám přesný průběh funkce $\ln p^0 = f(T)$, včetně hodnot pro 298,15 K a c) pro látky nepolárního a středně polárního charakteru jsou optimálním standardem *n*-alkany, pro které jsou přesné hodnoty p^0 známy v širokém teplotním intervalu.

Z předchozího je zřejmé, že stanovení chyby chromatografického stanovení p^0 pro široké spektrum organických sloučenin je velmi obtížné. Hlavním důvodem je skutečnost, že data dostupná v literatuře pro různé typy sloučenin jsou nekompatibilní, pokud jde o použité chromatografické podmínky, polaritu stacionárních fází, výběr standardů apod. V literatuře se uvádí s jistou opatrností⁷, že chromatografická metoda obecně umožňuje stanovit údaje o tlaku nasycených par při 298,15 K s chybou asi 9 % pro organické chloridy a (poly)aromatické uhlovodíky, mezi 1,9 a 21 % pro pesticidy a mezi 7 a 36 % pro polychlorované bifenyly. Detailnímu rozboru a porovnání chyb jednotlivých chromatografických metod se věnovala zatím jediná práce⁴⁸. Vychází z výsledků získaných pro jednotný experimentální materiál pěti homologických sérií typu H-(CH₂)_n-Y, kde Y = Cl, Br, CH = O, COOCH₃, OCOCH₃ a *n* ∈ (6, 16) za stejných chromatografických podmínek a s využitím *n*-alkanů jako standardů. Tlaky nasycených par těchto látek při 298,15 K se liší v rozmezí pěti řádů a výsledky studie vyjádřené ve formě průměrné chyby δ_{Φ} [%] = (1/N)Σ|δ|, kde *N* je počet experimentálních dat, jsou shrnuty v tabulce II. Hodnoty δ_{Φ} naznačují, že tři ze sledovaných modelů (RRT, KI1 a KI3) reprodukuje tlaky nasycených par naměřených přímou metodou u všech čtyřiceti látek s průměrnou chybou $\delta_{\Phi} < 12$ %, mezi jednotlivými sériemi jsou však patrně určité rozdíly.

6. Experimentální zařízení

Plynový chromatograf

V principu je pro stanovení fyzikálně-chemických veličin možno použít komerčně dostupné přístroje jakékoliv firmy. S ohledem na nutnost splnění požadavku konstantních chromatografických podmínek při měření elučních charakteristik série sledovaných látek je velkou výhodou, jsou-li přístroje vybaveny elektronickou kontrolou teploty a průtoku plynů, případně automatickým dávkovačem, který zaručuje nástřik konstantního objemu vzorků.

Stacionární fáze

Jak je zřejmé z teorie plynové chromatografie (kapitola 2.), závisí retence látek obecně na jejich těkavosti, která je ovlivňována velikostí molekul a interakcemi se stacionární fází, vyjádřenými aktivním koeficientem nebo veličinami s ním souvisejícími. Pro stanovení tlaků nasycených par a výparných tepel z retenčních údajů zásadně volíme nepolární stacionární fázi, abychom co nejvíce omezili účast specifických (polárních) interakcí na retenčním procesu. Jako příklad vhodných, komerčně dostupných kapilárních kolon s nepolární zakotvenou fází (většinou na bázi dimethylpolysiloxanu) od různých firem s prakticky srovnatelnými vlastnostmi můžeme uvést SPB-1 (Supelco), AT-1 (Alltech), HP-1 (Hewlett-Packard), DB-1 (J&W), 007-1 (Quadrex) a další.

Délka chromatografické kolony

Ačkoliv délka kolony není obecně nijak omezena, z praktického hlediska (ale i z hlediska přesnosti stanovení retenčního času či objemu), je účelné volit takovou délku, která pro všechny testované látky zaručuje účinnou separaci při rozumných (rozuměj ani příliš dlouhých ani příliš krátkých) retenčních časech. Podle charakteru analyzovaných látek se délka kolony obvykle pohybuje v rozmezí 1–10 m.

7. Závěr

Předběžné kompilační studie odhadují velikost souboru dat o tlacích nasycených par a výparných teplech stanovených chromatografickou metodou přibližně na 600 údajů, odpovídajících teplotě 298,15 K. Dominují především skupiny halogenderivátů, alkanů C6–C30, nasycených a nenasyčených alkoholů C9–C18, v menším zastoupení pak nalézáme údaje o alkyklyklohexanech C7–C13, ketonech C5–C9, esterech C5–C18 a dalších. Tato databáze nebyla doposud kompletně a detailně zpracována, neboť výsledky pro jednotlivé třídy sloučenin nebyly získány jednotným standardním způsobem, a proto neumožňují posoudit celkově chybu chromatografického stanovení (kapitola 5.). Usuzujeme-li z dílčích výsledků, získaných pro některé vybrané třídy sloučenin (zejména pro homologické série), pohybuje se hodnota relativní chyby chromatograficky stanovených výparných tepel v rozmezí do 1–2 % a u tlaků nasycených par v rozmezí 10–15 %, ovšem pouze pro nepolární či slabě polární látky a za předpokladu vhodně volených standardů i metodického postupu. Je na místě poznamenat, že chyba stanovení tlaků nasycených par chromato-

grafickou metodou je v takovém případě výrazně nižší, než chyba uváděná pro oblast nízkých tlaků u klasických metod, porovnáme-li výsledky různých laboratoří.

Seznam použitých symbolů

ΔC_p	rozdíl molárních tepelných kapacit, $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
$\Delta_{vap} H_m$	molární výparná entalpie, $J \cdot mol^{-1}$
$\Delta_s H_m$	molární výparná entalpie složky z kapalné stacionární fáze, $J \cdot mol^{-1}$
$\Delta_{sol} H_m$	molární rozpouštěcí entalpie, $J \cdot mol^{-1}$
$\Delta_E H_m$	molární dodatková směšovací entalpie, $J \cdot mol^{-1}$
I	Kovátsův retenční index
M	molární hmotnost, $g \cdot mol^{-1}$
p^0	tlak nasycených par, Pa
R	plynová konstanta, $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
$\Delta_{fus} S_m$	molární entropie tání, $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
T	absolutní teplota, K
T_M	absolutní teplota tání, K
t_R	retenční čas, min
t_M	mrtvý čas, min
t_R'	adjustovaný retenční čas, min
V_R	retenční objem, cm^3
z	počet uhlíkových atomů alkanu
γ	aktivitní koeficient
γ^∞	aktivitní koeficient při nekonečném zředění

LITERATURA

- Purnell H.: *Plynová chromatografie*. SNTL, Praha 1966.
- Churáček J.: *Analytická separace látek*, kap.6. SNTL, Praha 1990.
- Krejčí M., Pujarek J., Komers R.: *Výpočty a veličiny v sorpční kolonové chromatografii*. SNTL, Praha 1990.
- Smolková E., Feltl L.: *Analýza látek v plynném stavu*, kap. 10. SNTL, Praha 1991.
- Conder J. R., Young C. L.: *Physicochemical Measurements by Gas Chromatography*. Wiley, New York 1978.
- Vasiljev A. V., Alexandrov E. N.: *Usp. Khim.* 61, 689 (1992).
- Site A. D.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 26, 157 (1997).
- Kröhl T., Kästel R., König W., Ziegler H., Köhle H., Parg A.: *Pestic. Sci.* 53, 300 (1998).
- Tomková H., Pacáková V.: *Chem. Listy* 78, 229 (1984).
- Roth M.: *Chem. Listy* 87, 671 (1993).
- Beens J., Tijssen R., Blomberg J.: *J. Chromatogr., A* 822, 233 (1998).
- Barton A. F. M.: *Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters*. CRC Press, Boca Raton 1983.
- Flory P. J.: *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca 1953.
- Vilcu R., Puricel E.: *Rev. Roum. Chim.* 42, 163 (1997).
- González F. R., Castells R. C., Nardillo A. M.: *J. Chromatogr., A* 927, 111 (2001).
- Hoare M. R., Purnell J. H.: *Trans. Faraday Soc.* 52, 222 (1956).
- Chickos J. S., Hesse D. G., Hosseini S., Liebman J. F., Mendenhall G. D., Verevkin S. P., Rakus K., Beckhaus H-D., Rüchard Ch.: *J. Chem. Thermodyn.* 27, 693 (1995).

18. Verevkin S. P., Heintz A.: *J. Chem. Eng. Data* 44, 1240 (1999).
19. Verevkin S. P., Wandschneider D., Heintz A.: *J. Chem. Eng. Data*, 45, 618 (2000).
20. Nichols G., Orf J., Reiter S. M., Chickos J., Gokel G. W.: *Thermochim. Acta* 346, 15 (2000).
21. Puri S., Chickos J. S., Welsh W. J.: *Anal. Chem.* 73, 1480 (2001).
22. Herington E. F. G.: *Vapor Phase Chromatography*. Butterworths, London 1957.
23. Hamilton D. J.: *J. Chromatogr.* 195, 75 (1980).
24. Hinckley D. A., Bidleman T. F., Foreman W. T., Tuschall J. R.: *J. Chem. Eng. Data* 35, 232 (1990).
25. Kuo H. W., Wang J. D., Lin J. M.: *Chemosphere* 24, 1679 (1992).
26. Lei Y. D., Wania F., Shiu W. Y., Boocock D. G. B.: *J. Chem. Eng. Data* 44, 200 (1999).
27. Sherblom P. M., Gschwend P. M., Eganhouse R. P.: *J. Chem. Eng. Data* 37, 394 (1992).
28. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Feltl L.: *J. Chromatogr., A* 679, 307 (1994).
29. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Konečný K., Feltl L., Vrkoč J.: *J. Chromatogr., A* 719, 391 (1996).
30. Koutek B., Hoskovec M., Vrkočová P., Feltl L.: *J. Chromatogr., A* 759, 93 (1997).
31. Hawker D. W.: *Chemosphere* 25, 427 (1992).
32. Kovats E.: *Helv. Chim. Acta* 41, 1915 (1958).
33. Fischer R. C., Wittlinger R., Ballschmiter K.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 342, 421 (1992).
34. Spieksma W., Luijk R., Govers H. A. J.: *J. Chromatogr., A* 672, 141 (1994).
35. Krop H. B., van Velzen M. J. M., Parsons J. R., Govers H. A. J.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 309 (1997).
36. Tudor E.: *J. Chromatogr., A* 779, 287 (1997).
37. Foreman W. T., Bidleman T. F.: *J. Chromatogr.* 330, 203 (1985).
38. Eitzer B. D., Hites R. A.: *Environ. Sci. Technol.* 22, 1368 (1988).
39. Donovan S. F.: *J. Chromatogr., A* 749, 123 (1996).
40. Mackay D., Bobra A., Chan D. W., Shiu W. Y.: *Environ. Sci. Technol.* 16, 645 (1982).
41. Planck M.: *Ann. Phys.* 30, 574 (1887).
42. Růžička K., Majer V.: *AIChE J.* 42, 1723 (1996).
43. Daubert T. E.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 37, 3260 (1998).
44. Lyman W. J., Reehl W. F., Rosenblatt D. H. (ed.): *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*. ACS, Washington 1990.
45. Peacock L. A., Fuchs R.: *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5524 (1977).
46. Chickos J. S., Hosseini S., Hesse D. G.: *Thermochim. Acta* 249, 41 (1995).
47. Shiu W. Y., Ma K. C.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 29, 41 (2000).
48. Koutek B., Cvačka J., Streinz L., Vrkočová P., Doubský J., Šimonová H., Feltl L., Svoboda V.: *J. Chromatogr., A* 923, 137 (2001).

V. Svoboda^a and B. Koutek^b (^a*Department of Physical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Determination of Saturated Vapor Pressures and Heats of Vaporization from Gas Chromatography Retention Data**

In modelling the transport and fate of environmentally important chemicals, knowledge of physicochemical parameters such as the saturated vapor pressure (p^0) and heat of vaporization ($\Delta_{\text{vap}}H_m$) is critically important. In spite of that, direct measurements of the properties for higher-boiling substances at 298.15 K have been limited to a relatively small number of compounds and, due to experimental difficulties in the low-pressure region ($p^0 < 1$ kPa), some of these measurements are of doubtful accuracy. Gas chromatography (GC) is an alternative method for measuring p^0 and $\Delta_{\text{vap}}H_m$ data, offering advantages in terms of speed, size of solute sample, purity and stability requirements. In this article, several equations proposed to relate GC elution characteristics for low-volatility liquid and solid chemicals to their saturated vapor pressures and heats of vaporization are analyzed and compared. The results support the view that capillary GC is capable of providing $\Delta_{\text{vap}}H_m$ and p^0 data for non-polar and slightly polar compounds with relative errors of about ± 1 – 2 % ($\Delta_{\text{vap}}H_m$) and ± 10 – 15 % (p^0) if the method and reference standards are properly selected. Then, the errors are either comparable with or lower than those resulting from more cumbersome direct experimental techniques.

BIOKOMPATIBILITA POLYMERŮ MODIFIKOVANÝCH VYSOCE ENERGETICKÝMI IONTY

KATEŘINA WALACHOVÁ^a, LUCIE BAČÁKOVÁ^b,
BARBARA DVORÁNKOVÁ^c a VÁCLAV ŠVORČÍK^a

^aÚstav inženýrství pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6, ^bFyziologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^c3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 34 Praha 10, e-mail: vaclav.svorcik@vscht.cz

Došlo dne 7.VI.2001

Klíčová slova: polymery, iontová implantace, degradace, biokompatibilita

Obsah

1. Úvod
2. Využití iontové implantace při přípravě biomateriálů
3. Vliv substrátu na chování buněk
 - 3.1. Adhezivní vlastnosti
 - 3.2. Dopanty
 - 3.3. Morfolgie povrchu
 - 3.4. Elektrické vlastnosti
 - 3.5. Polarita povrchu
 - 3.6. Vliv karbonizace polymerů
 - 3.7. Chemické složení substrátu
 - 3.8. Modifikace malých oblastí
4. Závěr

1. Úvod

Při řízené interakci buněk se substrátem jsou aplikovány dvě základní strategie. První se snaží o vytvoření dokonale inertních materiálů, jež by nedovolovaly adhezi ani růst buněk na jejich povrchu. Tento typ materiálů je žádoucí např. při konstrukci kontaktních čoček nebo některých zařízení, která jsou v kontaktu s krví¹⁻³. Druhým přístupem je tvorba substrátů, jež by naopak podporovaly adhezi (uchycení), proliferaci (růst) a diferenciaci (vyzrávání) buněk. Pouze diferencované buňky jsou schopny správně plnit všechny své životní funkce. V transplantační medicíně je nutné správné fungování transplantátu a jeho integrace s okolními tkáněmi (v případě kostí, parenchymatických orgánů a obvykle také cév)^{4,5}. Tento typ umělých transplantátů může být před samotnou transplantací kolonizován pacientovými buňkami (*in vitro*), a tím může být sníženo riziko odmítavé reakce imunitního systému.

Dále jsou uvedeny dva příklady využití polymerních substrátů v medicíně (cévní náhrady, nosiče pro kultivaci kožního krytu). Bylo prokázáno, že snížení trombogenicity a podpoření správného fungování cévních náhrad může být dosaženo pokrytím povrchu umělé cévy vrstvou autologních buněk před implantací do organismu⁶. Tato metoda odpovídá základní

myšlence tkáňového inženýrství vytvářet funkční náhrady tkání kombinováním biologicky aktivních buněk a vhodných materiálů. Jde o poměrně mladou techniku, první pokusy byly zahájeny v 80. letech a první klinická data byla publikována v roce 1992 (cit.⁷). Výsledky dosažené při snižování trombogenicity naznačují, že jde o perspektivní metodu^{6,8}.

Dalším důležitým uplatněním polymerů je jejich využití jako růstových substrátů pro kultivaci buněk. Díky interdisciplinárnímu přístupu v ošetřování rozsáhlých popálenin mohou dnes přežít pacienti popálení na více než 80 % celkového povrchu těla. Nedostatek vhodných odběrových míst pro permanentní krytí je řešen kultivací epidermálních buněk – keratinocytů – *in vitro*. V poslední době se přistupuje ke kultivaci buněk na umělých nosičích, které mohou být spolu s nimi přeneseny na ránu pacienta^{9,10}. Tímto způsobem je možno předejít poškození buněk a nosiče zároveň slouží jako dočasný krytí¹¹.

2. Využití iontové implantace při přípravě biomateriálů

Uchycení, růst i vyzrávání buněk na umělých substrátech jsou ovlivňovány povrchovými vlastnostmi materiálu. Iontová implantace je perspektivní metodou pro povrchovou úpravu polymerů využívaných v medicíně, jelikož umožňuje kontrolovaně řídit biokompatibilitu materiálu, a tím ovlivňovat chování různých typů buněk¹²⁻¹⁷. Ukazuje se, že iontová implantace může zvýšit adhezi a následný růst buněk na polymerních substrátech^{13-15,18}. Další výzkum směřuje k tomu, aby iontovou implantací bylo dosaženo specifických vlastností (selektivní adheze určitého typu buněk, adheze buněk ve vymezených úsecích materiálu¹³, antibakteriální povrchy¹⁹ a podobně).

Vysoce energetické ionty, které jsou separovány v magnetickém a urychleny v elektrickém poli, jsou při implantaci rozptylovány na cílových atomech. Disipující energie způsobuje změny ve struktuře polymeru. Metoda implantace iontů do substrátu byla vyvinuta pro dotaci příměsí do materiálů pro elektroniku, kde je vyžadována plošná homogenita vyšší než 99,5 %. Expozice polymerů vysocí energetickým iontům způsobuje degradaci polymerních řetězců. Štěpení vazeb vede k tvorbě volných radikálů a následným chemickým reakcím. Již při relativně nízkých dávkách dochází k sítování řetězců²⁰, vzniku dvojných vazeb²¹, oxidaci²² a uvolňování plynných produktů²³. V závislosti na dávce ozáření jsou pozorovány různé stupně karbonizace^{24,25}, popř. grafitizace polymeru²⁶. Ozářený polymer obsahuje struktury analogické produktům vysokoteplotní degradace polymeru²⁷. Zatímco při pyrolýze je za vysokých teplot degradován celý objem vzorku, iontová implantace může být prováděna při pokojové teplotě a modifikována je pouze povrchová vrstva materiálu o tloušťce 1–1000 nm.

Pro biologické účely jsou nejčastěji implantovány ionty inertních plynů (Ne⁺, Ar⁺ (cit.^{13,28}), Kr⁺ (cit.¹⁴), Xe⁺ (cit.²⁹)), u kterých se předpokládá, že jejich přítomnost ve vrstvě nebude buňky nijak ovlivňovat. Dále jsou implantovány ionty biogenních prvků (O⁺, N⁺ (cit.^{14,15})), nebo v některých příp-

padech dokonce ionty známé svým působením proti růstu buněk, např. Ag^- pro vytváření „antiadhezních“ povrchů¹⁹.

Kromě charakteru iontu, jeho hmotnosti a dávky, je implantace polymeru ovlivněna i energií dopadajících iontů. Často bývají k přípravě materiálů pro biologické aplikace využívány nízké implantační energie (10–50 keV) (cit.^{17,19,29,30}), i když např. Satriano a spol.³¹ používá energii až 1 MeV. Použití nízkých energií vychází z předpokladu, že buňky pro své základní pochody využívají jen nejvrchnější vrstvy materiálu, a tedy není nutno modifikovat velké tloušťky³¹. Tsuji a spol.¹⁷ uvádějí, že růst buněk na iontově implantovaném substrátu (Ag^- ionty) byl ovlivněn použitou energií iontů. Rozpětí implantačních dávek iontů testovaných v biologických experimentech je velmi široké, přibližně od 10^{12} do 10^{17} iontů na cm^2 .

3. Vliv substrátu na chování buněk

Přestože některé savčí buňky jsou schopny růst v suspenzovaných kulturách, naprostá většina z nich je závislá na dobrém ukotvení. Tyto buňky se musí nejprve uchytit na povrchu vhodného substrátu, aby mohly začít plnit své fyziologické funkce. Správné fungování buněk kultivovaných na umělých podkladech významně závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech povrchu studovaných materiálů. Neupravené polymery jsou obvykle příliš hydrofobní nebo negativně nabitě, a proto nemohou být dostatečně kolonizovány buňkami. Jak bylo ukázáno^{12,15,32}, iontová implantace umožňuje upravit povrchové vlastnosti materiálu včetně jeho biokompatibility. Některé studie přisuzují lepší buněčnou adhezi po iontové implantaci zvýšené polaritě povrchu a přítomnosti oxidovaných struktur^{33,34}. Další autoři uvádějí jako možné vysvětlení vyšší biokompatibility zvýšení obsahu uhlíku v modifikované vrstvě^{15,32}. K vlastnostem často dávaným do souvislosti s biokompatibilitou materiálu patří také povrchová morfologie, adhezní a elektrické vlastnosti substrátu a přítomnost některých funkčních skupin.

3.1. Adhezní vlastnosti

Po ozařování Ar^+ ionty pozoroval Koh a spol.³⁵ zlepšení adhezních vlastností studovaného polymerního substrátu. Tento jev je přičítán zdrsnění povrchu, výraznému obzvláště po expozici vysokými dávkami iontů. Vysoká drsnost vede ke zvětšení povrchu a mechanickému přimknutí na rozhraní. Podobné výsledky uvádí i Kim a spol.³⁶

Dobrá adheze buňky k růstovému substrátu je základním předpokladem jejího normálního vývoje. Kromě přímého „navázání“ buněk k růstovému substrátu (předpokládá se vliv elektrostatických sil)^{14,37} je adheze zprostředkována také molekulami extracelulární matrice (vitronektin, fibronektin, kolagen, laminin, fibrinogen atd.) preadsorbovanými k podložnímu materiálu^{38–40}. Pevnost adheze buněk je zkoumána mechanicky (působením smykových sil) či enzymaticky (např. trypsinem)^{13,41,42}.

3.2. Dopanty

Díky změnám volného objemu a chemické aktivitě ozařovaného polymeru je u modifikované vrstvy ovlivněna penetrace a zabudování různých látek, jež mohou dále ovlivňovat

vlastnosti polymeru. Difuzí vhodných dopantů lze zvýšit elektrickou vodivost^{43–45} či biokompatibilitu^{16,46}. Švorčík a spol.⁴⁵ pozorovali na polyethylen (PE), že při nižších dávkách převažuje tvorba oxidovaných struktur a nárůst volného objemu, takže penetrace do modifikované vrstvy je usnadněna. U vyšších dávek se vlivem síťování řetězců utváří dvoj- a trojrozměrné struktury se sníženým podílem volného objemu, což snižuje penetraci iontů a látek do degradované vrstvy. Bylo např. zjištěno, že implantované ionty F^+ nejsou zabudovány do polymeru a unikají z modifikované vrstvy podobně jako ostatní plyné produkty^{47,48}. Jód penetroval do modifikované vrstvy a byl zde zabudován. Minimálně část atomů byla navázána na makromolekuly prostřednictvím volných radikálů, další část se vážala na implantací vytvořené dvojné vazby²². Také Davenas a spol.⁴⁹ pozorovali, že nízkými dávkami implantovaný polymer byl díky vzniku „lehce porézní struktury“ obohacen atomy jódu v modifikované vrstvě. V případě vysokých dávek pak jód v důsledku síťování do polymerního filmu nepenetroval.

Zajímavým parametrem z hlediska povrchových vlastností je koncentrační profil implantovaných iontů, chemických skupin vznikajících při ozařování a dopantů. Při stejných implantačních energiích mají lehčí ionty větší hodnotu středního doletu. To znamená, že těžší ionty se zabrzdí blíže k povrchu substrátu. Kusakabe a spol.⁵⁰ uvádějí, že implantované ionty se zřídka vyskytují na povrchu vzorků. Budeme-li pokládat za rozhodující hloubku pro růst buněk hloubku 0, je dopovací efekt implantovaných iontů malý. Výsledky zjištěné při dopování polymeru uhlíkem ovšem podporují ideu, že pro adhezi buněk není důležitá pouze nulová hloubka, ale i určitá tloušťka povrchové vrstvy⁵¹.

3.3. Morfologie povrchu

Vlivem iontové implantace dochází ke změnám povrchové morfologie polymeru. Např. působením kyslíkového plazmatu na polytetrafluorethylen (PTFE) byl substrát výrazně zdrsněn, kdežto po použití argonového plazmatu byla drsnost výrazně nižší³⁶. Při použití odpovídajících iontových svazků (Ar^+ , O^+) byla vytvořena v obou případech drsná vláknitá textura³⁶. Koh a spol.³⁵ popisují drsnost PTFE jako přímo úměrnou dávce Ar^+ iontů. Švorčík a spol.⁵² uvádějí, že u polyimidu dochází do určité dávky ke snižování volného objemu, a tím ke snížení drsnosti povrchu. S rostoucím poškozením v důsledku zvyšování dávek je povrch více zdrsněn. Při nejvyšších dávkách je pak povrch opět „uhlazen“. Autoři⁵² tento výsledek vysvětlují karbonizací a grafitizací modifikované polymerní vrstvy, což je doprovázeno zmenšováním volného objemu v důsledku síťování řetězců.

Je známo, že morfologie povrchu hraje při interakcích buňka–substrát významnou roli. Na uhlíkových kompozitech, jejichž povrch byl uměle zdrsněn, se buňky hladkého svalstva (SMC) natáčely ve směru podélných rýh⁵³. Snížení drsnosti se příznivě projevovalo na zvýšení adheze buněk⁵³. Drsnost zvyšuje hodnotu kontaktního úhlu a materiál se stává více hydrofobním. Lampin a spol.⁵⁴ uvádí, že adheze buněk embryí kuřat (CEC) rostla s drsností, zvýšil se jejich migrační potenciál, ale počet životaschopných buněk na drsnosti substrátu nezávisel. Inkubační polymeru v médiu dochází k adsorpci proteinů na jeho povrch, a tím k maskování vlivů drsnosti⁵⁴. Zlepšení adheze na drsnějších substrátech popisují např. Bowers a spol.⁵⁵ a Boyan a spol.⁵⁶ Naopak bylo publikováno^{53,57,58} i zhoršení

adhezních vlastností v souvislosti s drsností povrchu. O zanedbatelném vlivu drsnosti na iniciální adhezi buněk linie MG63 hovoří Lincks a spol.⁵⁹ Z uvedených skutečností je zřejmé, že výsledky týkající se vlivu drsnosti na chování buněk se liší pro různé substráty i použité buňky. Vysvětlením může být skutečnost, že nezáleží pouze na velikosti a vzdálenosti povrchových nerovností (topografii), ale také na jejich tvaru (morfologii)^{54,60,61}. Další příčinou rozporuplných pozorování může být skutečnost, že některé buňky jsou považovány za „rugofilní“ – tedy drsnomilné (např. makrofágy), jiné naopak za „rugofobní“ (např. fibroblasty)^{62–64}.

3.4. Elektrické vlastnosti

Iontová implantace způsobuje zvýšení elektrické vodivosti povrchové vrstvy polymeru^{52,65}. Děje se tak díky štěpení řetězců, tvorbě radikálů⁶⁶ a vzniku konjugovaných dvojných vazeb⁶⁷. K faktorům příznivě ovlivňujícím elektrickou vodivost se řadí též karbonizace a grafitizace modifikované vrstvy^{26,47}. Dalšího zvýšení vodivosti může být dosaženo penetrací dopantů⁶⁸.

Elektrické interakce jsou důležitým faktorem při pohybu a adhezi buněk⁶⁹. Negativně nabitá místa na buněčné membráně jsou využívána v rozpoznávacím procesu a při následné interakci buňky se substrátem^{70,71}. Dřívější studie prokázaly vliv elektrického náboje povrchu substrátu na fúzi makrofágů⁷². Adheze byla nejvyšší na kationtovém povrchu ve srovnání s neutrálním a aniontovým. Sugimoto a spol.⁶⁹ popisují, že s růstem záporného náboje sílila migrace buněk. Nabité skupiny substrátu navíc ovlivňují sorpci adhezních proteinů důležitých pro dobré uchycení a správný vývoj buněk⁷³.

3.5. Polarita povrchu

Z hlediska biokompatibility je zajímavým projevem iontové implantace do polymerů změna smáčivosti povrchu. Souvisí to se změnami chemického složení povrchové vrstvy a změnami drsností³⁵. Většina autorů uvádí, že při implantaci iontů do nepolárních polymerů dochází ke zvyšování polaritě materiálu v souvislosti se vznikem oxidovaných struktur^{12,17,27,36,47,74}. Tsuji a spol.¹⁹ uvádějí, že nárůst polaritě může být kromě oxidace odvozen též od zvýšené karbonizace povrchu po iontové implantaci. Kim a spol.³⁶ a Koh a spol.³⁵ nezávisle pozorovali, že při použití Ar^+ a O^+ iontů polarita původně málo polárního polymeru (PTFE) dále klesala. Pokles polaritě u implantovaných vzorků přičítají autoři zdrsnění povrchu. U polárních polymerů bylo pozorováno, že polarita klesala úměrně energii iontů, což je vysvětlováno degradací polárních skupin bočních řetězců¹⁹. Gavrilov a spol.²⁷ uvádějí, že polarita povrchu PE po iontové implantaci s dávkou roste, ale zůstává nižší než při použití plazmatu. Mnoho autorů uvádí, že v průběhu uskladnění a stárnutí polymerů ozářených plazmatem dochází ke zpětnému nárůstu hydrofobicity původně nepolárních substrátů. Morra a spol.⁷⁵ předpokládají, že tento efekt je způsoben reorientací částí řetězců z povrchové do podpovrchové vrstvy. Hnací silou je podle něj minimalizace povrchové energie. Hyun a spol.⁷⁶ využili iontové implantace do PET ke zmenšení pohyblivosti řetězců síťováním, a tím i k utlumení reorientace polárních částí řetězců.

Je známo, že polymery typu PE a polystyrenu (PS) jsou

v nemodifikované formě pro biologické účely příliš hydrofobní. V literatuře uváděné kontaktní úhly destilované vody jsou pro PE 97° a pro PS 90° (cit.⁷⁷). Vhodným řešením pro úpravu smáčivosti může být iontová implantace. Při ozařování polymerů dochází k oxidaci povrchové vrstvy a polymer se stává polárnějším^{12,15,31,32}. Hydrofilní povrchy vzniklé iontovou implantací mohou buď přímým kontaktem s buňkami nebo prostřednictvím sorpce proteinů aktivovat buněčnou adhezi⁷⁷. Výhodou takto vzniklých povrchů navíc je, že v průběhu stárnutí vzorků nedochází k poklesu polaritě, jako je tomu například u vzorků ozařovaných plazmatem^{27,75}.

Různí autoři studovali vliv polaritě materiálu na počet adheřujících buněk a došli k závěru, že adheze buněk na polaritě závisí, ale hodnota optimální smáčivosti a kontaktního úhlu se pro různé typy buněk liší. Na vzorcích PE např. byl pozorován soustavný nárůst počtu buněk s rostoucí smáčivostí⁷⁸. Naproti tomu na vzorcích PS nebyla závislost monotonní¹⁹. Matematický model popisující vztah mezi buněčnou adhezí a kontaktním úhlem nebyl zatím nalezen a podle Younga a spol.⁷⁹ existuje mezi oběma parametry pouze omezená souvislost. Byl studován také vliv polaritě na stupeň rozprostření buněk. Schakenraad a spol.⁷⁸ publikovali, že závislost rozprostření buněk na polaritě měla pro různé typy substrátů sigmoidní charakter.

3.6. Vliv karbonizace polymerů

Při vysokých dávkách dopadajících iontů může docházet v povrchové vrstvě polymeru ke karbonizaci, popř. grafitizaci materiálu^{26,48,52}. Ke karbonizaci dochází v důsledku uvolňování těkavých plynných produktů při iontové implantaci⁸⁰. Suzuki a spol.¹⁵ detegovali v polymerních vzorcích po implantaci amorfní uhlík a neuspořádané grafitické struktury. Gavrilov a spol.²⁷ popisují při implantaci iontů do PE vznik kondenzovaných aromatických struktur. Autoři²⁷ k tvorbě uhlíkatých struktur používali vysokých dávek (řádově 1.10^{16} iont. cm^{-2}) a mluví o prahové dávce, při jejímž překročení teprve dochází k tvorbě zejména amorfních uhlíkatých struktur. Grafitické a amorfní uhlíkaté struktury vzniklé v polymerech iontovou implantací vykazují vodivé a polovodivé vlastnosti¹⁸. V důsledku tvorby uhlíkatých struktur byla popsána také zvýšená biokompatibilita těchto materiálů^{15,51}.

Uhlíkaté materiály jsou známy svou vysokou biokompatibilitou, jež byla ověřena v podmínkách *in vitro* stejně jako *in vivo*^{51,54,81}. Jsou proto studovány možnosti zvýšení biokompatibility polymerů zvyšováním obsahu uhlíku v jejich povrchové vrstvě. Je využíváno např. depozice uhlíkových vrstev na povrchu polymerů⁸², dopování polymerů sazemí³² nebo iontové implantace¹⁵. Ve všech uvedených případech bylo prokázáno zlepšení adheze a růstu buněk. Biokompatibilita polymerů na bázi uhlíku indukovaná iontovou implantací je připisována především tvorbě amorfního uhlíku^{12,18}, přičemž vznik uhlíkatých struktur byl zaznamenán zpravidla u nejvyšších implantačních dávek a při vysokých energiích.

3.7. Chemické složení substrátu

Mnoha autory je popisována tvorba nových funkčních skupin v modifikovaných polymerech. Např. po implantaci N^+ a N_2^+ byla popsána tvorba aminů, po implantaci C^+ , O^+ , O_2^+ byl pozorován vznik karbonylů⁵⁰. Předpokládá se, že tyto nové

skupiny mohou příznivě ovlivňovat biokompatibilitu materiálu. Autoři dávají často do souvislosti adhezi buněk s chemickým složením modifikovaných substrátů. Proto se tato kapitola zabývá vlivem vybraných funkčních skupin na chování buněk.

Positivní vliv aminoskupin na adhezi a růst buněk byl pozorován již dříve⁸³. Kikuchi a spol.³⁹ pozorovali, že překročila-li koncentrace aminoskupin jistou prahovou hodnotu, byl počet adheřujících buněk (BAEC) přímo úměrný množství těchto skupin. V případě rozprostření buněk nebyla pozorována žádná prahová hodnota, rozprostření buněk bylo úměrné počtu aminoskupin³⁹. Důležitou roli při interakcích buněk s materiálem na bázi aminokyselin hrají elektrostatické síly mezi kladně nabitými aminoskupinami a záporně nabitými místy buněčné membrány^{84,85}.

Bylo publikováno⁸⁶, že hydroxylové, aldehydové a karboxylové skupiny vedou ke zvýšení adheze buněk k povrchu materiálu. Curtis a spol.³⁷ zjistili, že selektivní zablokování –OH skupin na povrchu modifikovaných PS vzorků způsobilo značný pokles v počtu adheřujících buněk. Také Smetana a spol.⁸⁷ ve svých experimentech pozorovali výrazný vliv oxidovaných struktur na chování buněk. Zvýšení obsahu –OH a –CO–NH– skupin v testovaných materiálech (polymery na bázi kyseliny methakrylové) vedlo ke zvýšenému rozprostření makrofágů na povrchu vzorků. Naproti tomu skupiny –COOH jejich rozprostření inhibovaly⁸⁷. Metodou *in vivo* bylo prokázáno¹⁶, že po naroubování kyseliny akrylové na modifikovaný PE se zvyšuje adheze makrofágů. Rovněž naroubovaný alanin (*in vitro*²⁹) zvyšuje adhezi a růst keratinocytů na PE exponovaném ionty Ar⁺ a Xe⁺.

3.8. Modifikace malých oblastí

Mikrodomény na povrchu polymeru mohou vznikat při implantaci nízkými dávkami iontů, kdy nedochází k překryvu modifikovaných oblastí, nebo v případě, je-li substrát ozařován přes masku⁸⁸. Jestliže je materiál hydrofobní, pak ozařovaný materiál obsahuje hydrofilní (modifikované) i hydrofobní (nemodifikované) oblasti. Velikost modifikovaných oblastí závisí na použité dávce iontů, resp. štěrbíně masky⁸⁸. Z literatury je známo, že normální cévní endotel má strukturu tvořenou obdobnými mikrodoménami. Lze předpokládat⁸⁸, že vhodná rovnováha mezi hydrofilií a hydrofobí může být klíčem ke zvýšení biokompatibility materiálů. Okano a spol.⁸⁹ ukázali, že na hydrofilní domény se selektivně vázal albumin, zatímco na hydrofobní domény γ -globulin a fibrinogen. Adsorbované proteiny tvořily organizovanou mozaiku, která byla řízena strukturou mikrodomén. Lee a spol.¹³ prováděli implantaci Ne⁺ a Na⁺ iontů do polyuretanu s použitím masky a pozorovali, že buňky endotelu přednostně adherovaly na domény upravené expozicí. Buňky z neupravených oblastí polymeru migrovaly do oblastí upravených. Tsuji a spol.¹⁹ studovali vliv implantace polymeru přes masku (4 mm \times 40 μ m) na orientaci buněk. Zjistili, že buňky se natáčely ve směru podélných rýh. Podobné výsledky na polyurethanu publikoval i Lee a spol.¹³

4. Závěr

Expozice povrchu polymerů iontům o vysoké energii je perspektivní metodou k modifikaci polymerů pro biomedicín-

ské účely. Při degradaci se v modifikované vrstvě štěpí chemické vazby a kromě plynných produktů se tvoří radikály a konjugované dvojné vazby (zvyšující elektrickou vodivost), u nepolárních polymerů vzrůstá polarita (zvyšuje se smáčivost), vzrůstá obsah uhlíkatých struktur a mění se povrchová morfologie polymerů. Tyto faktory, kromě dalších, významně ovlivňují biokompatibilitu povrchu polymeru. Je zřejmé, že na površích exponovaných polymerů dochází k lepší, pevnější a homogennější adhezi a proliferaci buněk, což bylo prokázáno metodami *in vitro* i *in vivo*.

Autoři děkují Grantové agentuře ČR za finanční podporu projektu č. 203/99/1626 a Grantové agentuře Akademie věd ČR za podporu projektu č. A 7011908.

LITERATURA

1. Kawamoto N., Mori H., Terano M., Zui N.: J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 8, 859 (1997).
2. Smetana K., Vacík J., Součková D., Pitrová Š.: Clin. Mater. 13, 47 (1993).
3. Cook A. D., Hrkach J. S., Gao N. N., Johnson I. M., Pajvani U. B., Cannizzaro S. M., Langer R.: J. Biomed. Mater. Res. 35, 513 (1997).
4. Greisler H. P., Tattersall C. W., Klosak J. J., Cabusao E. A., Garfield J. D., Kim D. U.: Surgery 110, 645 (1991).
5. Doik K., Matsuda T.: J. Biomed. Mater. Res. 37, 573 (1997).
6. Thornton M. A., Howard L. C., Patterson E. A.: Med. Eng. Phys. 19, 588 (1997).
7. Fischlein T., Zilla P., Meinhart J., Deutsch M.: Transplant. Proc. 24, 3043 (1992).
8. Fischlein T., Zilla P., Meinhart J.: J. Vasc. Surg. 19, 549 (1994).
9. Dvořánková B., Smetana K., Königová R., Singerová H., Vacík J., Jelínková M., Kapounková Z., Zahradník M.: Biomaterials 19, 141 (1998).
10. Dvořánková B., Smetana K., Vacík J., Jelínková M.: Folia Biol. 42, 83 (1996).
11. Zacchi V., Soranzo C., Cortivo R., Radice M., Brun P., Abatangelo G.: J. Biomed. Mater. Res. 40, 187 (1998).
12. Pignataro B., Conte E., Scandurra A., Marletta G.: Biomaterials 18, 1461 (1997).
13. Lee J. S., Kaibara M., Iwaki M., Sasabe H., Suzuki Y., Kusakabe M.: Biomaterials 14, 958 (1993).
14. Suzuki Y., Kusakabe M., Lee J. S., Kaibara M., Iwaki M., Sasabe H.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 65, 142 (1992).
15. Bačáková L., Švorčík V., Rybka V., Miček I., Hnатовicz V., Lisá V., Kocourek F.: Biomaterials 17, 1121 (1996).
16. Švorčík V., Rybka V., Hnатовicz J., Smetana K.: J. Mater. Sci., Mater. Med. 8, 435 (1997).
17. Tsuji H., Satonoh H., Ikeda S., Gotoh Y., Ishikawa J.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 141, 197 (1998).
18. Sato H., Tsuji H., Ikeda S., Ikemoto N., Ishikawa J., Nishimoto S.: J. Biomed. Mater. Res. 44, 22 (1999).
19. Tsuji H., Satoh H., Ikeda S., Ikemura S., Gotoh Y., Ishikawa J.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 148, 1136 (1999).

20. Wintergill M. C.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 15, 595 (1984).
21. Hnatowicz V., Kvítek J., Švorčík V., Rybka V.: Eur. Polym. J. 9, 1255 (1993).
22. Švorčík V., Prošková K., Rybka V., Hnatowicz V.: Polym. Degr. Stab. 60, 431 (1998).
23. Chang Z., Laverne J. A.: J. Polym. Sci., Polym. Chem. 38, 1656 (2000).
24. Mladenov G. M., Braun M., Emmoth B., Biersack J. P.: J. Appl. Phys. 58, 2534 (1985).
25. Calcagno L., Compagnini G., Foti G.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 65, 413 (1992).
26. Švorčík V., Arenholz E., Rybka V., Hnatowicz V.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 122, 663 (1997).
27. Gavrilov N., Yakusheva D., Kondyurin A.: J. Appl. Polym. Sci. 69, 1071 (1998).
28. Susuki Y., Kusakabe M., Kaibara M., Iwaki M., Sasabe H., Nishisaka T.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 91, 588 (1994).
29. Švorčík V., Walachová K., Prošková K., Dvořánková B., Ochsner R., Ryssel H.: J. Mater. Sci. Mater. Med. 11, 655 (2000).
30. Tsuji H., Saton H., Ikeda S., Ikemotoh S., Gotoh Y., Ishikawa J.: Surf. Coat. Technol. 103/104, 124 (1998).
31. Satriano C., Marletta G., Conte E.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 148, 1079 (1999).
32. Švorčík V., Rybka V., Hnatowicz V., Bačáková L., Lisá V., Kocourek F.: J. Mater. Chem. 5, 27 (1995).
33. Gao J. M., Niklason L., Langer R.: J. Biomed. Mater. Res. 42, 417 (1998).
34. McKeown N. B., Chang G., Niven J., Romaschin A. D., Wilson G. J., Thompson M., Kalman P. G.: ASAIO Trans 37, 477 (1991).
35. Koh S. K., Park S. C., Kim S. R., Choi W. K., Jung H. J., Pae K. D.: J. Appl. Polym. Sci. 64, 1913 (1997).
36. Curtis A. S. G., Forrester J. V., McInnes C., Lawrie F.: J. Cell Biol. 97, 1500 (1983).
37. Kim S. R.: J. Appl. Polym. Sci. 77, 1913 (2000).
38. Bordenave L., Rémy-Zolghadri M., Fernandes P. H., Barelille R., Midy D.: Endothelium 6, 267 (1999).
39. Kikuchi A., Taira H., Tsuruta T., Hayshi M., Kataoka K.: J. Biomater. Sci., Polym. Ed. 8, 77 (1996).
40. Garcia A. J., Vega M. D., Boettiger D.: Mol. Biol. Cell 10, 785 (1999).
41. Bačáková L., Mareš V., Lisá V., Švorčík V.: Biomaterials 21, 1173 (2000).
42. Bačáková L., Mareš V., Bottone M. G., Pellicciari C., Lisá V., Švorčík V.: J. Biomed. Mater. Res. 49, 369 (2000).
43. Calcagno L.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 105, 63 (1995).
44. Fink D., Klett R.: Braz. J. Phys. 25, 54 (1995).
45. Švorčík V., Prošková K., Hnatowicz V., Rybka V.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 149, 312 (1999).
46. Jankovskij O., Švorčík V., Rybka V., Hnatowicz J.: J. Appl. Polym. Sci. 60, 1455 (1996).
47. Švorčík V., Rybka V., Endršt R., Hnatowicz V., Kvítek J.: J. Electrochem. Soc. 140, 549 (1993).
48. Hnatowicz V., Kvítek J., Švorčík V., Rybka V.: Appl. Phys. A 58, 349 (1994).
49. Davenas J., Xu X. L.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 71, 33 (1992).
50. Kusakabe M., Suzuki Y.: Polym. Adv. Technol. 10, 713 (1999).
51. Švorčík V., Rybka V., Hnatowicz V., Bačáková L.: J. Mater. Sci. Lett. 14, 1723 (1995).
52. Švorčík V., Arenholz E., Rybka V., Hnatowicz V.: Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 122, 663 (1997).
53. Bačáková L., Starý V., Glosar P.: Eng. Biomater. 2, 3 (1998).
54. Lampin M., Warocquier-Clérout R., Legris C., Degrange M., Sigot-Luizard M.F.: J. Biomed. Mater. Res. 36, 99 (1997).
55. Bowers K. T., Keller J. C., Randolph B. A., Wick D. G., Michaels C. M.: Int. Oral Maxillofac Implants 7, 302 (1992).
56. Boyan B. D., Batzer R., Kieswetter K., Liu Y., Cochran D. L., Szmuckler-Moncler S., Dean D. D., Schwartz Z.: J. Biomed. Mater. Res. 39, 77 (1998).
57. Bačáková L., Balík K., Žižka S.: Eng. Biomater. 4, 19 (1998).
58. Bačáková L., Starý V., Kofroňová O.: Eng. Biomater. 4, 22 (1998).
59. Lincks J., Boyan B. D., Blanchard C. R., Lohmann C. H., Liu Y., Cochran D. L., Dean D. D., Schwartz Z.: Biomaterials 19, 2219 (1998).
60. Walboomers X. F., Monaghan W., Curtis A. S. G., Jansen J. A.: J. Biomed. Mater. Res. 46, 212 (1999).
61. Degasne I., Basle M. F., Demais V., Hure G., Lesourd M., Grolleau B., Mercier L., Chappard D.: Calcif. Tiss. Int. 64, 499 (1999).
62. Braber E. T., Jansen H. V., Deboer M. J., Croes H. J. E., Elwenspoek M., Ginsel L. A., Jansen J. A.: J. Biomed. Mater. Res. 40, 425 (1998).
63. El-Ghannam A., Starr L., Jones J.: J. Biomed. Mater. Res. 41, 30 (1998).
64. Brunette D. M., Chehroudi B.: J. Biomechan. Eng. – Transact ASME 121, 49 (1999).
65. Švorčík V., Endršt R., Rybka V., Hnatowicz V.: Mater. Lett. 28, 441 (1996).
66. Švorčík V., Hnatowicz V., Stopka P., Bačáková L., Ochsner R., Ryssel H.: Rad. Phys. Chem. 60, 89 (2001).
67. Doležel B.: *Die Beständigkeit von Kunststoffen und Gummi*. Carl Hauser Verlag, München 1978.
68. Miček I.: *Dizertační práce*. VŠCHT, Praha 1996.
69. Sugimoto Y.: Exp. Cell Res. 135, 39 (1981).
70. Weiss L., Ziegel R.: J. Teor. Biol. 34, 21 (1972).
71. Weiss L., Subjeck J. R.: J. Cell Sci. 14, 215 (1974).
72. Smetana K., Vytášek R., Štol M.: Int. J. Hematol. 56, 219 (1992).
73. Garrett Q.: Biomaterials 19, 2175 (1998).
74. Vasilets V. N., Hirata I., Iwata H., Ikada Y.: J. Polym. Sci., Polym. Chem. 36, 2215 (1998).
75. Morra M., Occhiello E., Garbassi F.: J. Colloid Interface Sci. 132, 504 (1989).
76. Hyun J., Barletta P., Koh K., Yoo S., Oh J., Aspnes D. E., Cuomo J. J.: J. Appl. Polym. Sci. 77, 1679 (2000).
77. Ramsay J., Rhazi B., Garnier A., Sapieha S., Chavarie C., Ramsay B. J.: Ferment. Bioeng. 83, 173 (1997).
78. Schakenraad J. M., Busscher H. J., Wilevuur C. R. H., Arends J.: J. Biomed. Mater. Res. 20, 773 (1986).

79. Young T. H., Yao C. H., Sun J. S., Lai C. P., Chen L. W.: *Biomaterials* 19, 717 (1998).
80. Prošková K.: *Dizertační práce*. VŠCHT, Praha 1999.
81. Thomas R. C., v knize: *Essentials of Carbon–Carbon Composites* (Thomas R. C., ed.). Royal Soc. of Chemistry, Cambridge 1993.
82. Sharbati R., Gianessi D., Cenni M. C., Lazzarini G., Verni F., Caterina R.: *Int. J. Artif. Organs* 14, 491 (1991).
83. McKeehan W. L., Ham R. G.: *J. Cell Biol.* 71, 727 (1976).
84. Nabeshima Y., Tsuruta T., Kataoka K., Sakurai Y.: *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 1, 85 (1989).
85. Kikuchi A., Kataoka K., Tsuruta T.: *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* 3, 355 (1992).
86. Klemperer H. G., Knox P.: *Lab. Pract.* 26, 179 (1977).
87. Smetana K., Štol M., Novák M., Daneš J.: *Biomaterials* 17, 1563 (1996).
88. Porté-Durrieu M.C., Aymes-Chodur C., Betz N., Baquey C.: *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 119 (2000).
89. Okano T., Kayatama M., Shinohara I.: *Makromol. Chem.* 179, 1121 (1978).

K. Walachová^a, L. Bačáková^b, B. Dvořánková^c, and V. Švorčík^a (^a*Department of Solid State Engineering, Institute of Chemical Technology, Prague,* ^b*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^c*3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Biocompatibility of Polymers Modified by High-Energy Ions**

The review deals with the degradation of polymers by high-energy ions. The most important changes of their chemical structure and physical, including surface properties caused by ion irradiation are discussed with respect to their biocompatibility. Dependences of adhesion and proliferation of smooth muscle cells and keratinocytes on physicochemical properties of modified polymers are studied.

Zavedená farmaceutická firma v americkém vlastnictví

hledá organického chemika

do výzkumných a vývojových laboratoří v Praze.

Zkušenosti se zvětšováním měřítka laboratorních syntéz a dobrá znalost angličtiny podmínkou.

Žádosti s profesním životopisem zašlete na:

Interpharma Praha, a.s., Komofánská 955, 143 10 Praha 12
fax: 02/4025144, e-mail: interpharma@interpharma-praha.cz

PŘEHLED METOD DETEKCE GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ORGANISMŮ V POTRAVINÁCH A POTRAVINÁŘSKÝCH SUROVINÁCH

KAMILA ZDEŇKOVÁ, JARMILA PAZLAROVÁ,
MARTINA MACKOVÁ a KATEŘINA DEMNEROVÁ

Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 27.VIII.2001

Klíčová slova: geneticky modifikovaný organismus, detekce nukleových kyselin, detekce proteinu

Obsah

1. Úvod
2. Metody založené na detekci nukleových kyselin
 - 2.1. Polymerasová řetězová reakce
 - 2.1.1. Detekce GMO v potravinách a potravinářských surovinách pomocí PCR reakce
 - 2.1.2. Kvantifikace GMO v potravinách pomocí PCR
 - 2.1.2.1. Kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR)
 - 2.1.2.2. Real-Time PCR
 - 2.1.3. Omezení PCR detekce GM potravin
 - 2.1.3.1. Degradace DNA
 - 2.1.3.2. Inhibice PCR
 - 2.1.4. Mikročipy
 - 2.2. Southernův přenos
 - 2.3. Analýza RNA
3. Metody založené na detekci proteinu
 - 3.1. Imunometody
 - 3.2. Určení aktivity produktu transgenů
4. Ostatní techniky používané pro detekci GMO
 - 4.1. Chromatografie
 - 4.2. Infračervená spektroskopie
5. Závěr

1. Úvod

Jako geneticky modifikovaný organismus (GMO) je označován organismus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací (definice ze zákona č. 153/2000 Sb.¹). Genetické modifikace (GM) jsou přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismu či změna genetického materiálu záměrným vnesením cizorodé informace do hostitelského orgánu. Termín transformace je používán pro označení procesu vnesení cizorodé DNA (cit.²).

Základem genových technologií je fakt, že chemické složení a molekulární struktura deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která je nositelkou dědičnosti, a způsob, jímž se uspořádání

bází DNA promítá do uspořádání aminokyselin v bílkovinách (genetický kód), jsou pro všechny živé organismy totožné. Je tedy možné přenášet hmyzí nebo rostlinné geny do buněk savců nebo lidské geny do bakterií.

Mezi geneticky modifikované organismy jsou řazeny organismy, do kterých byl pomocí metod genetického inženýrství vnesen gen o známém složení a funkci, nesoucí pouze požadovanou vlastnost. Ostatní geny zůstanou prakticky nedotčeny.

Uplatnění moderních biotechnologických postupů v zemědělství a v potravinářském průmyslu přináší značné úspory nákladů a může pomoci vyřešit problém nedostatku potravin způsobený neustále se zvyšující populací obzvláště v zemích třetího světa. Na druhé straně je při využívání GMO nezbytná opatrnost vzhledem k tomu, že možné nežádoucí projevy by mohly negativně ovlivňovat ostatní organismy včetně člověka. Rychlý, intenzivní výzkum a vývoj této technologie a kontrola jejího použití jsou však předpokladem, že zkušenosti budou přibývat, a tím omezení klesat³.

Možnost nežádoucích projevů musí být nezbytně respektována. V současné době v řadě zemí celého světa platí určitá omezení pro distribuci, prodej a využití GMO. V České republice podléhá proces nakládání s GMO zákonu č. 153/2000 Sb. Tento zákon byl schválen v květnu 2000, příslušné vyhlášky v říjnu téhož roku. Zákon zahrnuje problematiku „uzavřeného“, tj. v podstatě laboratorního nakládání s GMO, uvádění GMO do prostředí a do oběhu (na trh). Dále byla v České republice v r. 2000 schválena novela zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích ve znění zákona č. 306/2000. Novelizovaná vyhláška č. 324/1997 ve znění 24/2001 čl. 7 Sb. byla schválena 17.1.2001 s platností od 1.6.2001 s výjimkou paragrafu týkajícího se povinnosti značit geneticky modifikované potraviny s obsahem transgenů DNA 1 % a výše (bude uvedena v platnost 1.1.2002).

V současné době je výzkum zaměřen na přenos příslušných genových sekvencí do potravinářsky významných rostlin jako rýže, pšenice, ječmen, žito, rajčata, fazole a hrách². Mimo to se pracuje na zlepšení vlastností dalších druhů ovoce a zeleniny (brokolice, maliny, meloun apod.). Vedle zemědělských plodin lze očekávat další rozvoj přípravy geneticky modifikovaných mikroorganismů používaných při výrobě potravin (startovací kultury v mlékárenském průmyslu²), pivovarské kvasinky, pekařské droždí, v oblasti průmyslových rostlin pro přípravu farmak a plastů, živočichů pro přípravu farmak, možnosti využití zvířecích orgánů pro transplantace.

Kontrola potravinářských surovin i samotných potravin a určování přítomnosti transgenů je dnes široce se rozvíjející vědní oblastí, která spojuje znalosti genetického inženýrství, biochemie, mikrobiologie a dalších vědních disciplín. Při detekci GMO jsou kladeny vysoké požadavky na specifčnost a citlivost používaných postupů. Základní schéma detekce GMO zahrnuje odběr reprezentativního vzorku matrice, extrakci nukleových kyselin nebo proteinů, testovací metody potvrzující přítomnost transgenů, identifikaci transgenů a jeho kvantifikaci. Běžně používané postupy jsou shrnuty v tabulce I.

Tabulka I

Techniky běžně používané pro detekci geneticky modifikovaných organismů

Detekce nukleových kyselin	detekce DNA	PCR a její aplikace (multiplex PCR, nested PCR) kvantitativní kompetitivní PCR (QC PCR) Real-Time PCR Southernův přenos mikročipy reverzní transkripce – PCR (RT-PCR) northern hybridizace RPA (Ribonuclease Protein Assay) ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) western přenos (Imunoblot)
	detekce RNA	
Detekce proteinu	imunometody	
Ostatní techniky	určení aktivity produktu transgenu chromatografie infračervená spektroskopie	

2. Metody založené na detekci nukleových kyselin

Pro detekci GMO bývají často používány metody založené na detekci nukleových kyselin (NK). Mezi vhodné metody patří polymerasová řetězová reakce (PCR) a její variace – multiplex PCR, nested PCR, kvantitativní kompetitivní PCR (QC PCR), Real-Time PCR, reverzní transkripce – PCR (RT-PCR), Southern hybridizace, northern hybridizace a ribonuclease protein assay (RPA), založená na specifické vazbě bílkoviny na nukleovou kyselinu. Jedním z prvních kroků testů založených na detekci NK je jejich extrakce z testovaného vzorku potravin a potravinářských surovin. Extrakce nukleových kyselin zahrnuje lyzi buněčných membrán, inaktivaci buněčných nukleas a separaci nukleových kyselin od zbytků buněk. Efektivita metod založených na detekci nukleových kyselin závisí na kvalitě a čistotě extrahovaných nukleových kyselin. Kvalita DNA je udávána délkou fragmentů a stupněm poškození, které může být způsobeno vyššími teplotami, nízkým pH prostředí nebo působením nukleas. Některé typy potravin (např. pyré) jsou náročnější na výběr vhodné extrakční metody a purifikačního procesu (kapitola 2.1.3.).

Množství extrahované DNA lze stanovit elektroforeticky, fluorometricky nebo spektrofotometricky pomocí UV světla o vlnové délce 260 nm. Čistota extrahované DNA bývá určena z poměru absorbancí při 260 a 280 nm.

2.1. Polymerasová řetězová reakce

Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* reakce umožňující namnožení definovaných úseků DNA. Reakce je katalyzována termostabilní DNA polymerasou, např. *Taq* DNA polymerasou izolovanou z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. K namnožení cílové DNA se používá dvou oligonukleotidových primerů, které hybridizují s komplementárními řetězci DNA.

Vlastní PCR se skládá z cyklického opakování 3 základních kroků:

- 1) oddělení vláken dvojšroubovice DNA teplotní denaturací,
- 2) připojení primerů k jejich komplementárním úsekům v DNA (annealing),

3) elongace primerů *Taq* polymerasou.

Počet těchto cyklů (zpravidla 35 nebo 40) závisí na koncentračních poměrech v reakční směsi, požadovaném výtěžku a životnosti enzymu.

PCR umožňuje specifické a citlivé namnožení nízkého množství cílových sekvencí DNA. V takovém případě se jako post-PCR detekce většinou používá horizontální elektroforéza v agarosovém gelu. Při tomto způsobu detekce amplifikovaných produktů existuje riziko, že dojde k záměně nespecificky namnoženého úseku a specifického PCR produktu, zvláště pokud se jedná o produkty podobné velikosti. Pro snížení rizika získání falešně pozitivních výsledků může být produkt namnožení podroben následnému štěpení restrikcími endonukleasami^{4,5}.

Pro charakterizaci a konfirmaci PCR produktu je dále možné použít sekvenci DNA či Southernův přenos s digoxigeninem značenou oligonukleotidovou probou⁶. Po elektroforetickém dělení lze pomocí Southernova přenosu produktů potvrdit, že sekvence mezi primery je hledanou sekvencí⁶. Tento krok je velmi časově náročný, v praxi je zřídka využíván. Přístup je v souladu s postupem doporučeným pro analýzu geneticky modifikovaných brambor ve shodě s § 35 German Food Act⁷.

2.1.1. Detekce GMO v potravinách a potravinářských surovinách pomocí PCR reakce

Detekce GMO v potravinách pomocí PCR je komplexním víceparametrovým problémem. Proces určování přítomnosti GMO je složen z izolace templátové DNA (pre-PCR), vlastní PCR reakce, detekce namnožených produktů a vyhodnocení získaných údajů (post-PCR).

Kritické faktory pro pre-PCR jsou následující:

- homogenita analyzovaného vzorku,
- izolace templátové DNA,
- standardní proces pro odhad koncentrace genomové DNA a všech reakčních činidel používaných v reakci.

Pro PCR reakci jsou kritické tyto body:

- nastavení reakčních parametrů,
- dávkování reaktantů,
- teplotní a časový program.

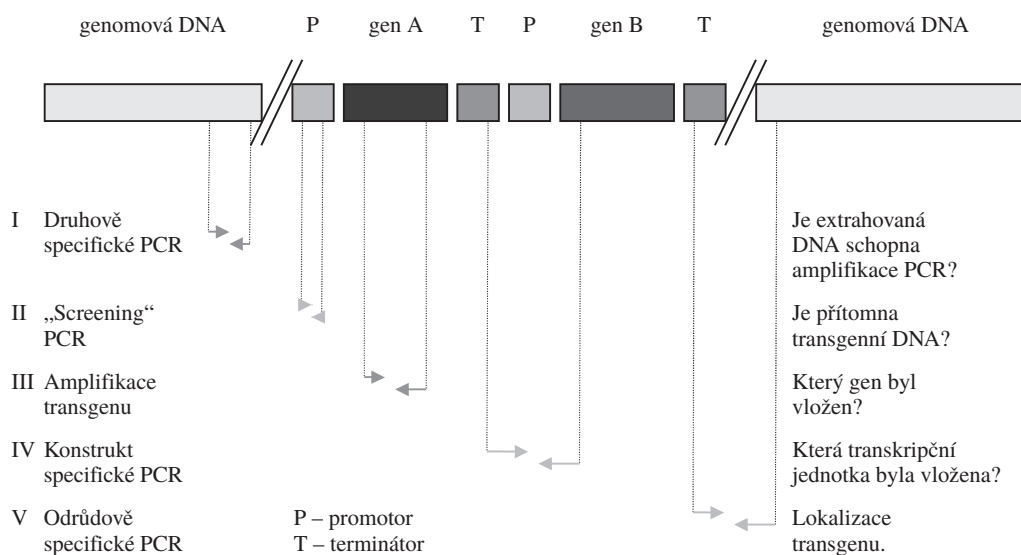


Schéma 1. Používaný PCR systém detekce geneticky modifikovaných potravin a potravinářských surovin

Pro post-PCR proces je kritickým bodem citlivost detekce amplifikovaných produktů.

V současné době jsou v evropských kontrolních potravinářských laboratořích specificky detegovány transgenní DNA sekvence převážně prostřednictvím PCR reakce. Vedle specifických metod jsou rozvíjeny (a již k dispozici) screeningové metody umožňující detekci téměř jakéhokoliv schváleného transgenu². PCR je používáno pro rychlé analýzy vysokých počtů vzorků. Je-li reakční produkt kratší než cca 1000 bp, může použití relativně dlouhých primerů (25–30 nukleotidů) s vysokou teplotou připojení ($T_m \sim 65\text{--}68\text{ }^\circ\text{C}$) pomoci zabezpečit přesnost reakce. Pro reprodukovatelnou detekci je rozhodující zajištění dostatečné citlivosti primerů, umístění primerů ovlivňuje informační hodnotu produktu PCR. Ve schématu 1 je znázorněn používaný PCR systém detekce geneticky modifikovaných organismů. Schéma ukazuje předem připravenou rostlinnou transkripční jednotku obsahující promotor (P), kódující sekvence (A, B) a terminátor (T). Dále jsou znázorněny rozdílné pozice komplementárních primerů a informace, které je možno získat z výsledků polymerasové řetězové reakce. Pokud jsou v dané reakci použity primery komplementární ke genomové DNA, ze získaných výsledků můžeme určit, je-li extrahovaná deoxyribonukleová kyselina schopna namnožení PCR procesem (viz schéma – úroveň I, Druhově specifické PCR). Např. u potravin částečně vyrobených z transformované sóji je prováděna detekce sójového lecitinového genu⁸. V případě použití primerů komplementárních k regulačním sekvencím mohou získané výsledky potvrdit přítomnost transgenní DNA v testovaném vzorku potravin nebo potravinářské suroviny (úroveň II, „Screening“ PCR). Příkladem je kvalitativní PCR systém specifický pro originální sekvence 35S promotoru viru kvěťákové mozaiky (P-35S promotor) či nos terminátoru z půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, jež patří mezi nejčastěji používané regulační sekvence při cíleném přenosu genů do rostlinných buněk pomocí *A. tumefaciens*⁹. Prostřednictvím primerů nasedajících uvnitř trans-

genní DNA bývá určen vložený gen (úroveň III, Amplifikace transgenu). Primery komplementární k regulační sekvenci a genu určují vloženou transkripční jednotku (úroveň IV, Konstrukt specifické PCR) a primery amplifikující úsek mezi regulační sekvencí a genomovou DNA určují druh transgenního organismu (úroveň V, Odrůdově specifické PCR).

Detekce genetických markerů indukujících genetické modifikace bývají také prováděny použitím specifického a citlivého namnožení DNA pomocí PCR procesu. Počet selekčních genů používaných při genových modifikacích rostlin je velmi široký, nejčastěji jsou používány geny kódující enzymy β -glukuronidasu (GUS) a luciferasu. V poslední době byl popsán autofluorescenční protein z medúzy tzv. green fluorescence protein (GFP), počet jeho použití jako markerového enzymu vkládaného do rostlin stále vzrůstá. Markery jsou velmi výhodné pro studium exprese transgenu, charakterizaci promotoru a rychlý screening velkého množství transformantů¹⁰.

Pomocí PCR metody může být prokázána pouze přítomnost sekvencí komplementárních ke zvoleným primerům. Získané výsledky nenaznačují, zda je templát DNA integrován do genomu rostliny ani jeho koncentraci. Vývoj kvantitativní PCR metody otevírá možnost použití této technologie pro zjišťování výsledků dříve získaných pomocí Southern hybridizace, např. odhad počtu kopií transgenu¹⁰.

Obměnou tradiční polymerasové řetězové reakce může být přidání násobného množství párů primerů do reakční směsi – multiplex PCR. Tato modifikace umožňuje analyzovat více parametrů v průběhu jednoho reakčního procesu, což je zvláště výhodné právě při detekci geneticky modifikovaných organismů. Přítomnost více párů primerů v reakční směsi však může způsobovat mnoho problémů, např. zvyšovat tvorbu nesprávných PCR produktů či diskriminaci delších DNA fragmentů¹¹. Pro multiplex PCR proces jsou vybírány primery s podobnou teplotou připojení (T_m). Délka namnožených produktů by měla být blízká, při větších rozdílech bývá upřednostňována ampli-

fikace kratšího úseku, což má za následek odlišné množství namnožených produktů. Ke snížení těchto rozdílů se v reakční směsi pro multiplex PCR používá pufr obsahující přísady *Taq* polymerasy, který snižuje konkurenci mezi amplikony, a tím diskriminaci delších fragmentů.

Ke zvýšení citlivosti a přesnosti může být použito tzv. nested PCR, která je složena ze dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí s 15–30 reakčními cykly. Templátem první reakce je DNA získaná extrakcí vzorku, templátem druhé je produkt získaný reakcí první. Jako primery jsou použity dva druhy oligonukleotidové sekvence (vnitřní a vnější). Vnitřní primery jsou komplementární k oblasti produktu získaného první reakcí¹². Protipólem zvýšené citlivosti je však vzrůstající riziko kontaminace. Přesnost je zvýšena díky faktu, že tato technika skoro vždy eliminuje namnožení nespecifických amplifikačních produktů. S vysokou pravděpodobností není žádný nespecifický produkt vznikající v průběhu první amplifikace dostatečně komplementární k vnitřním primerům. Z tohoto důvodu nemůže sloužit jako templát pro druhou PCR amplifikaci.

Závažnou chybou při analýze vzorků pomocí PCR je vznik falešně pozitivních a negativních výsledků. K detekci falešně pozitivních výsledků může dojít tak, že materiál připravený k vyšetření je v laboratoři kontaminován amplikony, které se dostaly do vzduchu během pipetování jiného, již amplifikovaného vzorku nebo příměsí GM organismu při zpracování testovaného vzorku. K falešně pozitivnímu výsledku stačí zcela nepatrná příměs směsi spadlá do dosud nezpracovaného vzorku. Riziko lze snížit důsledným prostorovým oddělením jednotlivých operací, používáním laminárních boxů, špiček s filtry zabráňujícími kontaminaci mechaniky pipet. Pro eliminaci nesprávných výsledků je vhodné do každé série testovaných vzorků zařadit pozitivní a negativní kontrolu. Jako negativní kontrola může být použita nemodifikovaná DNA nebo sterilní voda, jako pozitivní kontrola pak ověřená cílová sekvence. Výsledky získanými amplifikací negativní kontroly je ověřena nepřítomnost kontaminace reagentů, používaných přístrojů, pomůcek i pracovního prostředí. Pozitivní kontrolou bývá ověřena funkčnost všech kroků procesu, a tím zabránění zisku falešně negativních výsledků.

2.1.2. Kvantifikace GMO v potravinách pomocí PCR

Hlavním nedostatkem tradiční PCR je nepřesná kvantifikace, která je závislá na účinnosti amplifikačního procesu. Jestliže je reakční efektivita (*E*) konstantní pro každý reakční cyklus, koncentrace PCR produktu je úměrná množství počáteční cílové DNA. Efektivita však není parametrem konstantním, ale proměnným, ať již v rámci různých reakcí či v průběhu jedné reakce. Zejména v posledních cyklech polymerasové řetězové reakce, kdy jsou produkty tvořené v neexponenciální fázi neznámou reakční rychlostí. Za účelem dosažení maximální citlivosti PCR procesu je množství vytvořeného produktu měřeno v závěrečné fázi, kdy amplikon dosáhne maximálního výtěžku („plato fáze“). V této fázi procesu je korelace mezi koncentrací produktu a počátečním množstvím cílové DNA jen velmi nízká^{13–15}. Pro kvantifikaci DNA jsou používány techniky založené na principu PCR, takové jako kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR) a Real-Time PCR, které vyřešily problém určení vztahu mezi koncentrací cílové DNA sekvence a množstvím

PCR produktu vytvářeného během amplifikace. Nalezená řešení jsou následující:

1. Společná amplifikace cílové sekvence a vnitřního standardu v případě kvantifikace cílové sekvence pomocí QC PCR.
2. Měření PCR produktu v počátečních fázích reakce, kdy je *E* stále ještě konstantní, a proto jsou koncentrace produktu v korelaci s počáteční koncentrací cílové DNA sekvence. Tohoto principu využívají metody Real-Time PCR a PCR-ELISA.

Kritické body pro kvantitativní analýzu jsou selektivita reakce, reprodukovatelnost, přesnost a detekční limit¹⁰.

2.1.2.1. Kvantitativní kompetitivní polymerasová řetězová reakce (QC PCR)

Principem kvantitativní kompetitivní PCR metody (QC PCR) je amplifikace vnitřního DNA standardu společně s cílovou DNA. Kvantifikace přítomného GMO ve vzorku je dosaženo elektroforeticky, porovnáním intenzity proužku PCR produktu získaného namnožením cílové sekvence s vnitřním standardem^{16,17}. Rozdíl ve velikosti produktů se pohybuje maximálně v desítkách párů bazí¹⁸. QC PCR metoda byla úspěšně testována v mezinárodním kruhovém testu pro kvantitativní stanovení transgenů sóji Roundup Ready[®] a kukuřice Maximizer[®] (cit.¹⁶).

2.1.2.2. Real-Time PCR

Při Real-Time PCR dochází k monitorování vznikajícího produktu v průběhu celého amplifikačního procesu a kvantifikace je provedena v exponenciální fázi syntézy DNA¹⁹. První aplikací byl systém založený na fluorimetrickém měření vnitřní sondy. Tato vnitřní sonda je složena z krátkého DNA fragmentu, který obsahuje fluorofor i zhášeč fluorescence. Díky jejich vzájemné blízkosti potlačuje zhášeč všechnu fluorescenci ozářeného fluoroforu. DNA sekvence sondy je navržena uvnitř cílové sekvence. V průběhu každého cyklu je stejně jako při klasické polymerasové reakci dvojlátko DNA nejdříve separováno na jednotlivá vlákna, dále dochází k nasazení primerů a vnitřní sondy, posledním krokem je polymerace DNA polymerasou. DNA polymerasy používané v Real-Time PCR reakci vykazují silnou 5'–3' exonukleasovou aktivitu, v průběhu reakce tedy štěpí vnitřní sondu na jednotlivé nukleotidy. V tomto stadiu se zhášeč a fluorofor již nenacházejí v dostatečné blízkosti, a proto dochází k nárůstu fluorescenčního signálu. Další postup je založen na použití dvou vnitřních sond s fluoroforem (na 3' konci hybridizační sondy 1) a zhášečem fluorescence (na 5' konci hybridizační sondy 2). Sondy jsou navrženy k nasazení blízko sebe uvnitř cílové sekvence. První fluorofor po excitaci vnějším zdrojem emituje světlo, které je zachyceno druhou sondou, ovšem jen za předpokladu, že se obě sondy nacházejí v těsné blízkosti. V průběhu elongace dochází k uvolnění vnitřních sond, a tím k jejich oddálení. Druhá sonda tedy nezachytává energii vysílanou první, tím dochází k nárůstu fluorescence, která je měřena po nasazení primerů v každém reakčním cyklu²⁰.

Také je možno použít SYBR Green I, barvivo, které se váže na dsDNA. Pokud je barvivo SYBR Green I nenavázané, je intenzita jeho fluorescenčního signálu velmi nízká. Po

teplotní denaturaci je DNA rozpletena na jednotlivá vlákna, nasednutím primerů dojde k vytvoření krátkého úseku dsDNA, na kterou může být navázán SYBR Green I. V průběhu elongace dochází k zapolymerování vzrůstajícího množství barviva. K měření fluorescence dochází v každém cyklu, a to na konci elongační fáze. Začátek vzrůstu závisí na počáteční koncentraci cílové sekvence DNA²⁰.

Ačkoliv je vysoká cena nástrojů a specifických reagensů překážkou pro mnoho laboratoří, Real-Time PCR může být považován za v současné době nejpřesnější a nejvýhodnější z dostupných kvantitativních metod.

2.1.3. Omezení PCR detekce GM potravin

Pro svou rychlost, citlivost a specifčnost je PCR potenciálně velmi účinnou metodou detekce GM potravin. Významný vliv na výsledky získané PCR metodou může mít proces zpracování potravin.

2.1.3.1. Degradace DNA

Různé faktory přispívající degradaci DNA při zpracování potravin můžeme rozdělit na chemické, fyzikální a enzymové. Mezi tyto faktory jsou řazeny například:

- dlouhotrvající tepelná úprava, jako např. autoklávování používané při konzervářských procesech, může mít za následek hydrolyzu DNA na menší fragmenty nebo takové chemické modifikace DNA, které znemožňují PCR proces. Z tohoto důvodu může analýza konzervovaných potravin poskytovat falešně negativní výsledky,
- analýzu také znesnadňuje vzrůst chemické modifikace a hydrolyzy DNA při nízkém pH, např. výroby konzervované v octu nebo rajčatové pyré a produkty z rajských jablíček, jako třeba kečup. U těchto druhů potravin je analýza velmi obtížná a získané výsledky nemusí být správné,
- při prodlouženém skladování čerstvých potravin může docházet k enzymatické degradaci DNA pomocí nukleas.

2.1.3.2. Inhibice PCR

Problémem při použití metody PCR pro analýzu GM potravin je přítomnost inhibitorů reakce v testovaném materiálu, které redukuje účinnost amplifikačního procesu. Do této skupiny patří mnoho běžných složek potravin:

- kationy: např. Ca^{2+} , Fe^{3+} ,
- těžké kovy,
- uhlovodíky,
- tanin (kyselina tříslová), fenoly,
- soli: např. NaCl, dusitaný.

Studie popisované v literatuře indikují, že stupeň inhibice PCR je velmi závislý na typu potravin, např. vařená šunka vykazuje malou nebo žádnou inhibici, zatímco různé druhy měkkých sýrů kompletně inhibují PCR proces. Toto může vést k potenciálním analytickým problémům, např. jestliže byl analyzován obsah GM sóji v různě plněných pečivech, a to šunkou, měkkým sýrem, šunkou i měkkým sýrem zároveň²¹.

PCR inhibice může snadno vést k falešně negativním výsledkům, především jestliže je GM potravina analyzována v laboratoři, kde nemají dostatečné zkušenosti s analýzou potravin pomocí PCR metody. Znalost pravděpodobných in-

hibitorů v testovaných vzorcích může přispět k výběru vhodné analýzy, modifikaci rutinní extrakce a PCR procesu. V některých případech je možné snížit inhibiční efekt zředěním extraktu, čímž dochází ke zředění DNA i přítomných inhibitorů. Toto však nelze použít, pokud je koncentrace DNA ve vzorku nízká. V takovém případě mohou být extrahované nukleové kyseliny dále přečištěny a zakonzentrovány. Také přidávek PCR „enhancer“ do reakce snižuje stupeň inhibice. Takové analytické modifikace mohou zabránit získání falešně negativních výsledků a umožňují zvýšit důvěryhodnost získaných výsledků. Na druhé straně zvyšují čas a cenu analýzy²¹.

2.1.4. Mikročipy

Rychlý rozvoj molekulárně genetických metod umožňuje přípravu GMO, které obsahují nové znaky, vyšší množství a rozmanitost vkládaných genů i regulačních prvků. Např. Hemmer⁹ již publikoval některé schválené GM plodiny neobsahující promotor P-35S ani nos terminátor. Z toho vyplývá i potřeba analýzy vyššího množství genetických modifikací. To pak vyžaduje vývoj nových automatizovaných systémů, které mohou snížit nejen čas, ale i náklady analýz jako např. systémy založené na mikročipech²²⁻²⁴. Principem je spojení teplotní řetězové reakce a mikročipové gelové elektroforézy. Pojetí je založeno na miniaturizaci nástřiku, zpracování i analýze vzorku v jednoduchém zařízení. Toto uspořádání dovolu-uje rychlou (cca 1 minuta/cyklus) a účinnou amplifikaci DNA na čipech následovanou elektroforetickým rozdělením a detekcí amplifikovaných produktů. Ke snížení času analýzy dochází redukcí počtu potřebných termálních cyklů. Metoda umožňuje detekci PCR produktů po proběhnutí pouhých 10 termálních cyklů, s celkovým časem analýzy okolo 20 minut. Počáteční koncentrace cílové sekvence DNA bývá nižší než 15 kopií v nástřikovaném objemu²⁵.

Ačkoliv již bylo publikováno několik článků o PCR-mikrosystémech rozdílné složitosti²⁵⁻²⁷, jen některé aplikace byly dále rozvíjeny pro detekci DNA. Jednou z nich je surface plasmon resonance (SPR), která může být aplikována jak při detekci DNA, tak proteinů²⁸. Minunni a spolupracovníci²⁹ navrhli použití biosenzorů, včetně SPR pro GMO analýzu. Obdrželi předběžné dobré výsledky s elektrochemickým biosenzorem s imobilizovanými oligonukleotidovými probami komplementárními k P-35S promotoru a nos terminátoru. Testovaný systém byl více citlivý pro detekci P-35S promotoru než nos terminátoru²⁹.

2.2. Southernův přenos

Southernovým přenosem (Southern blotting) je označován přenos DNA na hybridizační membránu z gelu po předchozí elektroforéze. Pro přenos DNA se užívá název Southernův přenos podle E. M. Southerna, který tuto techniku v roce 1975 zavedl. Pro přenosy dalších typů makromolekul se později začaly užívat názvy northern blotting (přenos) pro RNA a western blotting (imunoblotting) pro bílkoviny. Northern i Southernův přenos vyžadují izolaci nukleových kyselin ze vzorku. Nejčastějšími postupy jsou kapilární a elektroforetický přenos či aplikace vakua. Prostá difuze se nepoužívá³⁰.

Southernův přenos patří mezi vlivné postupy dostupné pro molekulární charakterizaci transformovaných rostlin, pomocí

kteřé mohou být získány informace o složitosti vložení transgenů, počtu přítomných kopií, integračním stavu počtu míst na chromosomu, kde by mohl být transgen vložen. Metoda může být také použita pro evidenci integrace transgenů, včetně vložení do mnohonásobných míst. Nejlepších výsledků analýzy bývá dosaženo, pokud je analyzovaný materiál produkován použitím *Agrobacteria*. V tomto případě je T-DNA hranicí, poskytující typické spojení mezi vektorem a rostlinnou DNA, jíž bývá využito¹⁰.

2.3. Analýza RNA

V mnoha případech jsou analýzy exprese transgenů zaměřeny na proteiny nebo jiné finální produkty, protože fenotypovým projevem exprese má být právě akumulace specifických proteinů. Jestliže není možné provést analýzu proteinů, často lze požadovaných výsledků dosáhnout analýzou RNA transkriptů. Dokonce v případech, kdy jsou známy výsledky analýzy proteinů, poskytl analýza RNA užitečné informace o akumulaci transkriptu a jeho stabilitě, dále pomohla při objasňování nepředpokládaných fenotypových projevů. Takové techniky jako reverzní transkripce – PCR (RT-PCR), northern přenos a ribonuclease protein assay (RPA) mohou být použity pro měření množství RNA¹⁰.

Metoda RT-PCR využívá schopnosti reverzní transkriptasy přepsat templátovou mRNA do cDNA, ta je poté podrobena PCR procesu. Nejdříve je provedena izolace totální RNA nebo čisté mRNA z testovaného vzorku a pomocí DNasy jsou odstraněny zbytky DNA, dále je RNA podrobena reverzní transkripci a polymerasové řetězové reakci. Popisovaná metoda může být použita jako rychlá a relativně vysoce účinná screeningová metoda určení přítomnosti specifického transkriptu. Výhodami RT-PCR v porovnání s northern přenosem a RPA jsou malá množství potřebného materiálu, vysoká citlivost a snadnost přípravy vzorku¹⁰.

Jestliže použijeme RT-PCR, je nutné umět rozlišit mezi produkty vzniklými z amplifikace genomové DNA vzorku a produkty syntézy cDNA z RNA vzorku *in vitro*. Proto je požadováno zpracování vzorku pomocí DNasy a dále by měly být použity takové primery, aby amplifikace vzorku DNA byla buď nemožná, nebo aby amplifikované produkty měly jinou velikost než amplikony vzniklé z cDNA¹⁰.

3. Metody založené na detekci proteinu

Metody založené na detekci proteinu (imunologické a enzymové) – detegují produkt transgenů nebo metabolity, jejichž produkce je ovlivněna vloženým genem. Tyto metody mají dva významné limity, které brání jejich použití jako rutinních detekčních metod. První nevýhodou je dispozice jen mála protilátek specifických proti proteinům produkovaným expresí vloženého genu. Druhou nevýhodou pro aplikaci těchto analýz je degradace proteinů v průběhu zpracování potravin. V případě, že jsou vhodné protilátky k dispozici, jsou vyvinuté metody vhodné pouze pro čerstvé potravinové suroviny¹⁰.

3.1. Imunometody

Imunochemické detekční metody jsou založeny na specifické reakci mezi antigenem (Ag) a protilátkou (Ab). Jsou

běžně používány pro studium akumulace proteinů v transgenických rostlinách. Pro detekci GMO jsou nejčastěji používány dva typy imunochemických metod:

- western přenos (imunoblot),
- ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

Obě tyto metody mají do značné míry doplňující se přednosti a slabé stránky.

Sendvičová ELISA je založena na použití dvou protilátek. První protilátka, imobilizovaná na povrch nosiče, interaguje s antigenem. Druhá, enzymem značená protilátka, reaguje s jinými determinantními skupinami na odlišné části molekuly antigenu. Po přidání chromogenního substrátu nebo substrátu a chromogenu je výsledná enzymová reakce vyhodnocena fotometricky³¹.

Výhodou western hybridizace oproti ELISA jsou schopnost stanovit molekulární hmotnost proteinu; reprodukovatelné výsledky mohou být dosaženy i při použití ne zcela přečištěných protilátek. Western přenosy jsou však časově náročnější a kvantitativní výsledky jsou určovány s menší přesností. Naproti tomu ELISA metody jsou méně provozně náročné, vysoce specifické, citlivé a relativně snadno proveditelné¹⁰.

Typickým problémem, se kterým se setkáváme při použití imunometod, je nevhodné pozadí, které může být způsobeno specifickou interakcí protilátek (primární i sekundární, jestliže je použito více druhů) s proteinem v extraktu. Odezva pozadí může být často snížena nebo odstraněna úpravou koncentrace protilátek či použitím vhodného blokačního činidla. Podmínky blokování vhodnými proteiny bývají pro každý protein určeny empiricky¹⁰.

Při ELISA-PCR metodě je amplifikační produkt značen dioxigeninem během amplifikační reakce probíhající v přítomnosti dioxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP). Poté je PCR produkt hybridizován s probou značenou biotinem, která specificky rozpoznává sekvenci uvnitř cílové DNA. Následuje imobilizace biotinem označeného hybridu na streptavidinem pokrytou mikrotitrační destičku. Po promytí je kvantifikováno množství navázaných hybridů pomocí značené protilátky. Metoda PCR-ELISA využívá druhé strategie kvantifikace (kapitola 2.1.2.), polymerasová řetězová reakce je zastavena před poklesem amplifikační efektivity. ELISA byla použita pro kvantifikaci relativně nízkého množství PCR produktu^{32,33}. Přestože metoda byla aplikována v různých oblastech³⁴ a GMO detekční kit využívající tohoto principu je na trhu dostupný (D-Genos, Angers, France), nenašla široké uplatnění při kvantifikaci obsahu GMO v potravinách a potravinářských výrobcích.

3.2. Určení aktivity produktu transgenů

Cíleným fenotypovým projevem vloženého genu bývá nejčastěji protein se specifickou aktivitou. Tato aktivita může i nemusí být enzymatická a může být měřena pomocí biochemických metod nebo biometod – např. rezistence rostliny vůči hmyzu nebo patogenům. V každém případě je důležité pamatovat, že tato aktivita je v mnoha případech nejvíce řízená fenotypem rostliny. Tento fakt může být rozhodující pro pochopení fenotypového projevu. Je důležité uvědomit si, že při používání metody měření aktivity je měřena enzymová aktivita a při imunometodách je měřena hladina akumulovaných proteinů¹⁰.

4. Ostatní techniky používané pro detekci GMO

4.1. Chromatografie

Pokud se liší vlastnosti GMO od nemodifikovaného organismu, např. složení mastných kyselin nebo triglyceridů, mohou být tyto rozdíly detegovány prostřednictvím tradičních chemických metod založených na chromatografickém principu. Toho je možné využít například při detekci oleje získaného z GM kanoly pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní ionizační spektrometrií (HPLC-MS). Při vyšetřování složení triglyceridů³⁵ byl v triacylglycerolovém podílu zaznamenán vyšší obsah triacylglyceridů v oleji z GM kanoly, který vykazuje vyšší oxidační stabilitu díky vysokému obsahu kyseliny stearové a laurové. Tyto výsledky jsou shodné s ostatními výsledky obdrženy při studii oxidační stability v sóji a v kanolovém oleji z nových odrůd pomocí HPLC-FID³⁶.

Nicméně, tato metoda je průkazná pouze tehdy, pokud je složení GM rostlin nebo získaných produktů významně odlišné od složení nemodifikovaných organismů. Mimo to jsou tyto metody vhodné spíše pro kvalitativní analýzu než pro kvantifikaci geneticky modifikovaných organismů. Např. nízké přídavky GM kanolového oleje se změnou skladbou triacylglyceridů k tradičnímu kanolovému oleji nebude s vysokou pravděpodobností detegováno vzhledem k přirozeně se vyskytujícím změnám ve složkách nemodifikovaného oleje.

4.2. Infračervená spektroskopie

Určité zásahy do genomu organismu mohou změnit i strukturu vláken v rostlinách, přestože nejsou detegovatelné žádné významné rozdíly ve složení proteinů nebo olejů (např. Roundup Ready sója). Změny ve struktuře mohou být zaznamenány pomocí infračervené spektroskopie³⁷. Nicméně rozlišit malé množství GMO v nemodifikovaných produktech je v tomto případě rovněž značně obtížné, stejně jako v případě použití chromatografických metod.

5. Závěr

Z výše uvedeného přehledu je zřejmé, že v současné době existuje řada principiálně rozdílných metod, jež mohou být použity pro kvantifikaci a charakterizaci transgenní DNA, případně výsledného produktu její exprese v potravinách a potravinářských výrobcích. Při výběru vhodných detekčních metod pro konkrétní materiál je vždy předem nutné zvážit výpočetní hodnotu, citlivost, specifčnost a další možnosti každého metodického postupu. V souvislosti s tím je důležité přihlídnout též k charakteru, složení a původu testovaného materiálu, jež mohou ovlivnit extrakci DNA nebo bílkovin ze suroviny, a zvolit dostatečné množství kontrol, které by snížily možnost vzniku falešně pozitivních i falešně negativních výsledků. Vzhledem k tomu, že se vždy jedná o analýzy citlivé na přesnost provedení, je laboratorní zručnost a zkušenost v dané problematice nezbytnou podmínkou pro úspěšné testování GMO.

LITERATURA

1. Zákon č. 153/2000 Sb. o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a produkty.
2. Klein T. M., Harper E. C., Svab Z., Sanord J. C., Fromm M. E., Maliga P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 8502 (1988).
3. Směrnice č. 90/220/EHS o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí.
4. Meyer R.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 201, 583 (1995).
5. Pietsch K., Waiblinger H. U., Brodmann P., Wurz A.: Dtsch. Lebensm.-Rundsch. 93, 35 (1997).
6. Hupfer Ch., Hotyél H., Sachse K., Engel K.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 205, 442 (1997).
7. L 24.01-1B/VV Anon. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG.
8. Meyer R., Jaccaud E.: IX. Conference of EURO FOOD CHEIM, Interlaken 1997.
9. Hemmer W., v knize: BATS-Report 2 – Agency for Biosafety Research and Assessment of Technology Impacts of the Swiss priority Programme, Basel 1997.
10. Register C. J.: TIBTECH. 15, 141 (1997).
11. Atlas R. M., Bej A. K., v knize: Methods for General and Molecular Bacteriology, str. 418. American Society for Microbiology, Washington 1994.
12. Newton C. R., Graham A., v knize: PCR. BIOS Scientific Publishers, Oxford 1994.
13. Bindler G., Dorlhac de Borne F., Gadani F., Gregg E., Guo Z., Klus H., Maunders M., Mueller L., Negishi H., Pijnenburg H., Ward M., Zuber J.: CORESTA Bull. 77, 1999 (1999).
14. Gadani F., Bindler G., Pijnenburg H., Rossi L., Zuber J.: Beitrage Tabakforsch. Int. 19, 85 (2000).
15. Rasmussen R. P.: The Rapid Cyclist. 2, 1 (1994).
16. Studer E., Rhyner C., Lüthy J., Hübner P.: Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 207, 207 (1998).
17. Hardegger M., Brodmann P., Hermann A.: Eur. Food Res. Technol. 209, 83 (1999).
18. Ferré F., v knize: Gene Quantification (Ferré F., ed.). Adv. Biomed. Technol. Birkhäuser, Boston 1998.
19. Vařtilingom M., Pijnenburg H., Gendre F., Brignon P.: J. Agric. Food Chem. 47, 5261 (1999).
20. Boehringer Mannheim GmbH Roche Molecular Biochemicals: LightCyclerTM System, 2000.
21. Hübner P., Studer E., Häfliger D., Stadler M., Wolf C., Looser C.: Accred. Qual. Assur. 4, 292 (1999).
22. Sanders G., Manz A.: Trends Anal. Chem. 19, 364 (2000).
23. Lemieux B., Aharoni A., Schena M.: Mol. Breeding 4, 277 (1998).
24. Souteyrand E.: Analysis 27, 639 (1999).
25. Khandurina J., McKnight T. E., Jacobson S. C., Waters L. C., Foote R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. 72, 2995 (2000).
26. Ibrahim S. M., Lofts R. S., Jahrling P. B., Hencal E. A., Weedn V. W., Northrup M. A., Belgrader P.: Anal. Chem. 70, 2013 (1998).
27. Waters L. C., Jacobson S. C., Kroutchinina N., Khandurina J., Foote R. S., Ramsey J. M.: Anal. Chem. 70, 5172 (1998).

28. Rich R. L., Myszka D. G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 54 (2000).
29. Minunni M., Tombelli S., Chiti G., Mascini M.: *Euro-analysis XI, Eur. Conference Anal. Chem., Lisboa 2000*.
30. Sambrook J., Russel D. W., v knize: *Molecular Cloning a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor)*. Laboratory Press, New York 2001.
31. Králová B., Rauch P., v knize: *Bioanalytické metody*. Ediční a audiovizuální centrum VŠCHT, Praha 1995.
32. González I., García T., Fernández A., Sanz B., Hernández P. E., Marín R.: *J. Appl. Microbiol.* 66, 231 (1999).
33. Landgraf A., Reckmann B., Pingoud A.: *Anal. Biochem.* 198, 86 (1991).
34. Taoufik Y., Froger D., Benoliel S., Wallon C., Dussaix E., Delfraissy J. F., Lantz O.: *Eur. Cytokine Network* 9, 197 (1998).
35. Byrdwell W. C., Neff W. E.: *J. Liq. Chromatogr., Relat. Technol.* 19, 2203 (1996).
36. Neff W. E., Mounts T. L., Rinsch W. M., Konishi H., El-Agaimy M. A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1101 (1994).
37. Hurburgh C. R., Rippke G. R., Heithoff C., Roussel S. A.,

Hardy C. L.: *Proceedings of PITTCON 2000 – Science for the 21st Century*, New Orleans, March 2000.

K. Zdeňková, J. Pazlarová, M. Macková, and K. Demnerová (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Review of Detection Methods of GMO in the Raw and Processed-Food Matrices**

Genetically modified (GM) organisms are used for production of GM food raw materials and food itself. This brings benefit to food production but also a certain health risk. The novel Czech food legislation requires labelling food containing more than 1 % of GM products. The methods of detection of GM products in raw and processed food are based on the determination of nucleic acids (PCR, analysis of RNA transcripts) or protein determination (transgene product activity, immunoassays). Certain types of GM products can be detected by chromatography or IR spectroscopy. All the methods have certain limitations (sensitivity, presence of inhibitors, etc.). This review summarizes application and suitability of the described methods for analysis of GM products.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

STANOVENÍ AMINONAFTALENŮ A AMINOBIFENYLŮ KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ S AMPEROMETRICKOU DETEKCI NA DIAMANTOVÉ FILMOVÉ ELEKTRODĚ

JOSEF CVAČKA^a, GREG M. SWAIN^b, JIŘÍ BAREK^c
a JIŘÍ ZIMA^c

^aÚstav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ^bDepartment of Chemistry, Michigan State University, 320 Chemistry Building, East Lansing, MI 48824-1322, U.S.A., ^cUNESCO laboratorň elektrochemie životního prostředí, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Hlavova 2030, 128 43 Praha 2
e-mail: cvacka@uochb.cas.cz

Došlo dne 8.VI.2001

Klíčová slova: diamantová filmová elektroda, elektrochemická detekce, kapalinová chromatografie, aminobifenyl, aminonafталeny

Úvod

Uhlíkové elektrodové materiály (skelný uhlík, uhlíková vlákna, grafit) jsou běžně používány pro elektroanalytická měření. Tyto materiály mají obdobné vnitřní uspořádání – ve své struktuře obsahují šestičlenné kruhy uspořádané do vrstev, přičemž každý uhlíkový atom je vázán pomocí hybridních sp^2 orbitalů se třemi sousedními atomy. Zbývající $2p_z$ orbitaly vytvářejí systém delokalizovaných π elektronů, zajišťující elektrickou vodivost. Jednotlivé materiály se od sebe liší zejména velikostí a uspořádáním krystalických domén. Povrch těchto materiálů je nehomogenní a obsahuje množství funkčních skupin, nejčastěji karbonylové a hydroxyskupiny. Elektrochemické vlastnosti těchto materiálů byly studovány během posledních tří desetiletí, a proto je poměrně hodně známo o vztazích mezi strukturou materiálu a jeho reaktivitou¹⁻³. Zcela jiná situace je u elektrodových materiálů na bázi diamantu.

Problematika využití diamantových elektrod pro elektroanalytická měření se začala intenzivně zkoumat teprve v poslední době, první práce v této oblasti byly publikovány v osmdesátých letech^{4,5}. Strukturální uspořádání atomů v krystalové struktuře diamantu je zcela odlišné od uspořádání atomů v materiálech na bázi grafitu. Každý atom uhlíku je vázán prostřednictvím svých sp^3 hybridizovaných orbitalů s dalšími čtyřmi atomy, a vytváří se tak pravidelné tetraedry. Diamant se vyznačuje mimořádnou mechanickou i chemickou stabilitou. Je jedním z nejlepších přírodních izolátorů a pro jeho elektroanalytické využití⁶⁻⁸ je nutné jej dopovat atomy jiných prvků. Dopování se nejčastěji provádí atomy bóru a podle koncentrace dopantu lze získat diamant s polovodivými nebo poloko-

vovými vlastnostmi. Pokud je koncentrace atomů bóru vyšší než celková koncentrace donorů (např. dusíkových atomů), vykazuje diamantový materiál vodivost typu p .

Nejčastěji jsou diamantové elektrody používány ve formě tenkých polykrystalických filmů. Diamantové filmy se připravují^{6,7} chemickou depozicí par (CVD – chemical vapor deposition) při použití zhavených vláken nebo mikrovlnného ohřevu. K depozici diamantového filmu je nejčastěji používána směs methanu a vodíku při objemovém poměru C/H 0,5 až 2,0 % a tlaku 10 až 100 torr. Další parametry systémů jsou: teplota nosiče 800 až 1000 °C, výkon mikrovlnného zdroje 1000 až 1300 W, případně teplota vlákna ~2100 °C. Atomární vodík přítomný v reaktoru zabraňuje depozici nenасыcených sp^2 hybridizovaných uhlíkových struktur. Potlačuje se tak vznik grafitického uhlíku v diamantovém filmu. Dopování bórem je dosaženo přidáváním diboranu do směsi plynů, případně je možno použít pevný nitrid bóru, který za podmínek panujících v plazmovém hořáku postupně reaguje s atomárním vodíkem na diboran. Koncentrace atomů bóru v diamantovém filmu mohou dosáhnout až 10 000 ppm B/C, diamantový film pak vykazuje rezistivitu menší než 0,1 Ω .cm. Zajímavé je, že při použití pevného nitridu bóru je do krystalické mřížky diamantu zabudováno jen velmi málo atomů dusíku. Jako nosič se nejčastěji používá destička z křemíku s nízkým odporem, lze použít i wolfram nebo molybden. Destičku je nutno předem očistit a přeleštit brusnou směsí složenou z diamantového prášku a B_2O_3 . Zachycené částice slouží jako krystalizační centra pro růst diamantového filmu. Rychlost tvorby diamantového filmu za popsanych podmínek je zhruba 0,1 až 1,0 $\mu\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$, depozice filmů o tloušťce několik mikrometrů tak trvá řádově 24 hodin. Tímto způsobem je možno vyrobit diamantové filmy o ploše až několik cm^2 . Vzniklé filmy jsou polykrystalické, s ostrými, dobře vyvinutými krystaly o velikosti 0,5 až 3 μm .

Diamantové filmy poskytují v Ramanových spektrech charakteristický pás při 1332 cm^{-1} , odpovídající fononové linii prvního řádu⁹. Přítomnost amorfního uhlíku nebo nediamantových uhlíkových inkluzí se v těchto spektrech projevuje při 1500 až 1600 cm^{-1} . Kvalitní diamantové filmy vykazují v této oblasti minimální rozptyl.

Ve srovnání s ostatními uhlíkovými materiály se diamantové filmové elektrody (DFE) vyznačují mimořádnou stabilitou (cit.⁷ a práce tam citované). Diamantové elektrody nevykazují známky poškození při anodické polarizaci v kyselých, neutrálních i alkalických roztocích, v přítomnosti chloridových nebo fluoridových aniontů. U diamantových filmů nebyla za zmíněných podmínek pozorována důlková koroze, zdrsnění povrchu, ani delaminace filmu. Elektrochemické vlastnosti DFE (cit.^{6,7}) jsou ovlivněny zejména typem dopantu a jeho koncentrací, morfologickými vlastnostmi (přítomností povrchových defektů a primární krystalografickou orientací), přítomností nečistot uhlíku nemajících strukturu diamantu a druhem povrchové terminace (H, F, O aj.). Povrch diamantového filmu terminovaného vodíkem má obdobnou strukturu jako alkany, a proto má jen velmi nízkou tendenci adsorbovat polární sloučeniny z roztoku. Díky tomu jsou elektrodové

procesy, které zahrnují adsorpci intermediátů na povrch elektrody (např. vývoj vodíku, kyslíku nebo halogenů) silně zpomaleny. Vyžadují větší přepětí, aby probíhaly dostatečně rychle. Potenciálové okno, definované jako rozdíl potenciálů, při kterých dosahuje anodický i katodický proud hodnoty 50 μA , je v neutrálních a kyselých roztocích u diamantových elektrod nejčastěji $\sim 3,5$ V. Například v 0,5 mol.l⁻¹ H₂SO₄ dochází k vývoji vodíku při $-1,25$ V, kyslík se začíná vyvíjet při $+2,3$ V (v. SVE)⁷. Potenciálové okno je značně závislé na kvalitě diamantového filmu, špičkové diamantové filmy mohou mít potenciálové okno až 4,4 V (cit.¹⁰). Pokud však diamantový film obsahuje velké množství nečistot (uhlíku nemajícího strukturu diamantu), může se velikost potenciálového okna snížit na 2,5 až 2,7 V, což je rozsah pozorovaný u skelného uhlíku nebo u pyrolytického grafitu. Diamantové elektrody díky svému širokému potenciálovému oknu umožňují provádět elektrochemické reakce při potenciálech, kterých není možno (nebo pouze s velkými obtížemi) dosáhnout jiným způsobem. Uvnitř potenciálového okna vykazují diamantové filmy velmi nízké hodnoty kapacity elektrické dvojvrstvy, 1 až 5 $\mu\text{F.cm}^{-2}$. Pro skelný uhlík byly zjištěny hodnoty 30 až 40 $\mu\text{F.cm}^{-2}$. Předností diamantových filmových elektrod je i podstatně nižší zbytkový proud a šum ve srovnání např. se skelným uhlíkem. To má za následek podstatné vylepšení poměru signál/šum, a tedy i meze detekce.

Amperometrická detekce aminonaftalenů a aminobifenylů na elektrodách ze skelného uhlíku (GCE) patří dnes mezi běžně používané metody v HPLC a FIA. Aminonaftaleny a aminobifenylu jsou stanovovány v různých matricích, např. v dehtu¹¹, mořské vodě¹², kůži hlodavců¹³ a jako příměsi v průmyslových chemikáliích¹⁴. Separace látek je dosahováno na reverzních fázích ve směsích methanolu nebo acetonitrilu s pufrům při pH nižších než 6,0. Půlvolný potenciál jednotlivých látek závisí na pH a složení mobilní fáze, pro měření se nejčastěji používá potenciál $+0,9$ V (v. Ag/AgCl). Meze detekce se pohybují od $2 \cdot 10^{-8}$ mol.l⁻¹ do $2 \cdot 10^{-7}$ mol.l⁻¹. Práce, zabývající se detekcí nebo mechanismem oxidace aminonaftalenů a aminobifenylů na diamantových filmových elektrodách (DFE) dosud publikovány nebyly. V současné literatuře je však možno nalézt publikace věnující se stanovení některých strukturálně blízkých látek metodou FIA. Elektrochemickou oxidací polyaminů na polykrytalických DFE v průtokové injekční analýze se zabývali Koppang a spol.¹⁵ V prostředí uhličitáňového pufru o pH 10,0 a vloženém potenciálu $+0,78$ V (v. Ag/AgCl) látky poskytovaly signál lineárně závislý na koncentraci v rozmezí $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹. Hydrazin¹⁶ lze stanovit pomocí FIA v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ NaOH při vloženém potenciálu $+0,75$ V (v. Ag/AgCl). Lineární kalibrační závislosti byly získány pro koncentrace hydrazinu $1 \cdot 10^{-7}$ až $3 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, mez detekce byla $2 \cdot 10^{-9}$ mol.l⁻¹. Granger a spol.⁸ publikovali FIA stanovení dopaminu s lineární koncentrační závislostí v rozmezí $1 \cdot 10^{-7}$ až $3 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹ a mez detekce $3 \cdot 10^{-9}$ mol.l⁻¹ v prostředí 0,1 mol.l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7,2) při vloženém potenciálu $+0,5$ V (v. Ag/AgCl). Stejní autoři⁸ se věnovali stanovení chlorpromazinu v systému FIA. V prostředí 0,01 mol.l⁻¹ HClO₄ a při $+0,8$ V (v. Ag/AgCl) naměřili lineární kalibrační přímky pro koncentrace $3 \cdot 10^{-7}$ až $3 \cdot 10^{-3}$ mol.l⁻¹, mez detekce byla $4 \cdot 10^{-9}$ mol.l⁻¹. Serotonin¹⁷ lze v metodě FIA rovněž detegovat amperometricky na DFE s mezí detekce $1 \cdot 10^{-8}$ mol.l⁻¹.

V této práci jsou shrnuty výsledky srovnání DFE a klasické

elektrody ze skelného uhlíku jako pracovních elektrod pro amperometrickou detekci aminonaftalenů a aminobifenylů v kapalínové chromatografii. Jako modelové sloučeniny byly zvoleny 1-aminonaftalen (1-AN) a 2-aminobifenyl (2-AB), které patří mezi často stanovované genotoxické látky.

Experimentální část

Přístroje a zařízení

Průtokový systém pro měření ve FIA a HPLC režimu byl sestaven z vysokotlakého čerpadla MILTON ROY ConstaMetric III (LDC Analytical, USA), autosampleru 717plus (Waters, USA), elektrochemického detektoru s tenkovrstvou celou BAS CC-5 (Bioanalytical Systems, Inc., USA), potenciostatu OMNI 90 (Cypress Systems, Inc., USA) a zapisovače Servogor 124 (LEM Instruments, Inc., USA). V systémech FIA byl mezi pumpu a dávkovač zařazován tlumič pulzů vyrobený z plastové nádoby naplněné skleněnými kuličkami a otočené dnem vzhůru. Tlumení zajišťoval malý objem stlačeného vzduchu v horní části nádoby. V případě HPLC měření byla do systému zařazena kolona Adsorbosphere HS C18 (150 × 4,6 mm, 7 μm , Alltech USA). Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována. Kostry všech přístrojů byly vzájemně spojeny a uzemněny do společného bodu.

Průtoková měřicí cela byla zapojena tříelektrodově. Pracovní elektrodou byla destička ze skelného uhlíku GC-30 (Tokai Ltd., USA) o rozměrech zhruba 15 × 10 mm nebo křemíková destička s diamantovým filmem obdobných rozměrů. Efektivní plochu elektrody určoval otvor v 1 mm silném neoprenovém těsnění, jehož rozměry 9 × 1,5 mm byly stejné při všech experimentech. Pokud uvažujeme 10% stlačení gumového těsnění, byl objem měřicí cely přibližně 12 μl . Jako pomocná elektroda sloužilo nerezové tělo měřicí cely a referentní elektroda byla argentchloridová. GCE byla před každým měřením opláchnuta destilovanou vodou, 3 minuty leštěna na sametové tkanině brusným práškem (Alumina, Buehler Micropolish II, 0,05 μm , USA), opláchnuta destilovanou vodou a sonikována dvakrát 10 min ve vodě. Po opětovném opláchnutí destilovanou vodou a vysušení byla připravena k měření. Použitá elektroda D121698 byla tvořena polykrytalickým diamantovým filmem dopovaným atomy bóru s dobře vyvinutými krystaly o velikosti 0,5 až 3 μm na křemíkovém nosiči. Ramanova spektra vykazovala intenzivní pás při 1332 cm^{-1} , rozptýl při 1500–1600 cm^{-1} , typický pro nečistoty amorfního uhlíku nemající strukturu diamantu, byl velmi nízký. DFE byla před každým měřením pouze opláchnuta destilovanou vodou a vysušena.

Reagencie

Zásobní roztoky modelových sloučenin 1-aminonaftalenu (Fluka, >99 %) a 2-aminobifenylu (Aldrich, 97 %) o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ mol.l⁻¹ byly připraveny v methanolu (Fisher Scientific, USA). Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny ředěním zásobních roztoků methanolem nebo mobilní fází. Pro přípravu mobilních fází a roztoků standardů byla používána deionizovaná voda (E-pure, Barnstead, USA), methanol a acetonitril chromatografické čistoty (Fisher Scien-

Tabulka I

Velikosti šumu (pA) a zbytkového proudu (pA) pro různé mobilní fáze při dvou různých vložených potenciálech (v. Ag/AgCl)

Mobilní fáze	GCE (+0,1 V)		DFE (+0,1 V)		GCE (+0,5 V)		DFE (+0,5 V)	
	šum	zbytkový proud	šum	zbytkový proud	šum	zbytkový proud	šum	zbytkový proud
I ^a	37	-378	7	-14	56	5301	14	518
II ^b	44	76	7	6	60	1446	16	657
III ^c	56	233	16	72	72	2992	24	1968
IV ^d	44	245	8	88	44	2771	2	1566
V ^e	44	141	9	51	40	3052	24	2370

^a 0,1 mol.dm⁻³ fosfátový pufr o pH 4,0; ^b 0,1 mol.dm⁻³ fosfátový pufr o pH 7,0; ^c 0,1 mol.dm⁻³ fosfátový pufr o pH 9,0; ^d 0,1 mol.dm⁻³ fosfátový pufr o pH 7,0/methanol (1:1, v/v); ^e 0,1 mol.dm⁻³ fosfátový pufr o pH 7,0/acetonitril (1:1, v/v)

tific, USA), hydrogenfosforečnan draselný, hydroxid draselný (oba Fisher Scientific, USA) a kyselina trihydrogenfosforečná (Mallinckrodt, Inc., USA).

Výsledky a diskuse

Šum a zbytkový proud

Velikost šumu základní linie je významným parametrem měřicího systému. Z hlediska určení meze detekce je výhodné oddělit konstantní složku šumu od šumu nízkofrekvenčního a vysokofrekvenčního. Za konstantní složku šumu je odpovědný nabíjecí proud elektrodové dvojvrstvy a elektrochemické reakce na povrchu elektrody. Tato složka bývá označována jako zbytkový proud a toto označení je používáno i v této práci. Vysoká hodnota zbytkového proudu omezuje prakticky použitelný potenciálový rozsah a klade vyšší přístrojové nároky na jeho kompenzaci. Ostatní složky šumu souvisí mimo jiné s homogenitou elektrodového povrchu a přímo ovlivňují meze detekce analytů. V této práci jsou tyto složky shrnuty pod pojmem šum.

Dosud publikované práce^{2,4} dokumentují nízký šum na DFE v prostředí vodných roztoků solí. V následujících experimentech bylo zjišťováno, zda podobně nízký šum a zbytkový proud je pozorován i v případě běžně používaných mobilních fází pro HPLC a FIA, tj. pufrů a jejich směsí s organickými modifikátory. Vliv elektrody na sledované parametry byl zjišťován v systému FIA pro fosfátové pufrů o koncentracích 0,1 mol.l⁻¹ a jejich směsi s methanolem a acetonitrilem. Při průtoku 1 ml.min⁻¹ a dvou vložených potenciálech +0,1 V a +0,5 V v. Ag/AgCl byl šum i zbytkový proud odečítán přesně po 1 hodině od vložení příslušného potenciálu na elektrodový systém. Velikost šumu byla měřena jako absolutní velikost rozkmitu základní linie v jednotkách proudu, zbytkový proud pak jako velikost proudu základní linie odečítaná od polohy písátka zapisovače při rozpojeném elektrickém obvodu. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. I.

Z tabulky je zřejmé, že diamantová elektroda vykazuje ve srovnání s GCE nižší hodnoty šumu i zbytkového proudu pro všechny mobilní fáze. Nižší hodnota šumu u DFE je dána malým množstvím povrchových funkčních skupin schopných elektrochemické reakce na poměrně homogenním povrchu diamantového filmu. Nízká hodnota zbytkového proudu rovněž souvisí s odlišnými vlastnostmi povrchů obou elek-

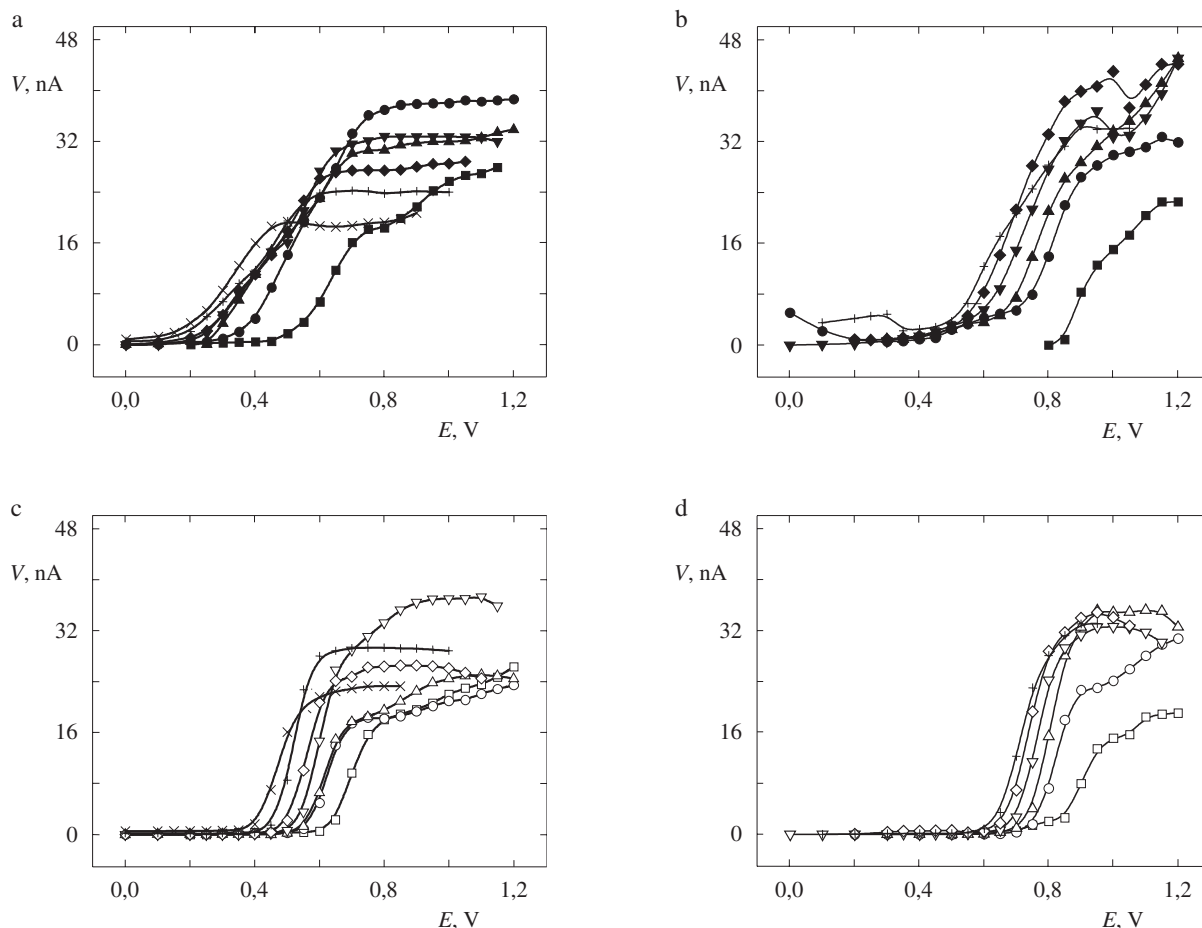
trodových materiálů, jejichž elektrické dvojvrstvy mají odlišnou kapacitu. Přítomnost organického modifikátoru a pH mobilní fáze výrazněji neovlivňují hodnoty šumu u žádné z elektrod. Zbytkový proud u GCE i DFE je značně ovlivněn hodnotou pH, vliv má i přítomnost organického modifikátoru. Rozdíly ve zbytkovém proudu mezi diamantem a skelným uhlíkem jsou výraznější při nižším vloženém potenciálu +0,1 V v. Ag/AgCl a více se projevují s klesajícím pH mobilní fáze.

Hydrodynamické voltamogramy

Hydrodynamické voltamogramy poskytují základní představu elektrochemického chování studovaných analytů v průtokovém systému. Jejich znalost umožňuje optimalizovat podmínky detekce, zejména vybrat vhodnou mobilní fázi a zvolit nejvýhodnější vložený potenciál.

Měření hydrodynamických voltamogramů 1-AN a 2-AB byla prováděna v systému FIA v mobilních fázích obsahujících 50 % methanolu a 50 % fosfátového pufru o koncentraci 0,05 mol.l⁻¹, jehož pH bylo upraveno na požadovanou hodnotu pomocí roztoků H₃PO₄ nebo NaOH. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml.min⁻¹. Každý bod hydrodynamického voltamogramu odpovídá průměrné výšce píku vypočítané z 10 nástříků 20 μl roztoku analytu připraveného v příslušné mobilní fázi (koncentrace 1.10⁻⁶ mol.l⁻¹). Uváděné hodnoty potenciálů jsou vztaženy k argentchloridové referenční elektrodě.

Z obr. 1 je patrné, že průběh hydrodynamických voltamogramů 1-AN není na obou typech elektrod totožný. 1-AN poskytuje ve všech mobilních fázích na obou elektrodách jednu hlavní vlnu, přičemž v kyselých prostředích se navíc objevuje při pozitivnějších potenciálech ještě druhá vlna. Vlny na skelném uhlíku jsou ve srovnání s vlnami naměřenými na diamantu položenější, což zřejmě souvisí s větší odporem elektrody ze skelného uhlíku. Půlvalnový potenciál se snižuje zhruba o 30 mV (DFE) a o 39 mV (GCE) na jednotku pH se vzrůstající hodnotou pH mobilní fáze, přičemž hodnoty půlvalnových potenciálů jsou na diamantové elektrodě vyšší v průměru o 100 mV. Tento rozdíl půlvalnových potenciálů je zřejmě způsoben nízkou adsorpcí meziproductů elektrochemické oxidace 1-AN na povrchu diamantového filmu, a proto je nutné vyšší přepětí, aby reakce probíhala dostatečně rychle. Výšky vln 1-AN nejsou příliš rozdílné na obou typech elektrod, nejvyšší vlna byla pozorována v případě DFE při pH 6,0, v případě GCE při pH 4,0.



Obr. 1. Hydrodynamické voltamogramy 1-aminonaftalenu (a, c) a 2-aminobifenylu (b, d) naměřené pomocí diamantové filmové elektrody (c, d) a elektrody ze skelného uhlíku (a, b) v mobilních fázích methanol/fosfátový pufr (1:1, v/v), pH pufru: □ pH 2, ○ pH 4, Δ pH 5, ▽ pH 6, ◇ pH 7, + pH 8 a ■ pH 2, ● pH 3, ▲ pH 5, ▼ pH 6, ◆ pH 7, + pH 8, × pH 10, V – výška píku, E – vložený potenciál

V případě 2-AB bylo pozorováno obdobné chování analytu na obou typech elektrod jako v případě 1-AN (obr. 1). 2-AB poskytuje jednu až dvě vlny v závislosti na pH mobilní fáze a jeho vlny na skelném uhlíku jsou více položeny. S rostoucím pH klesá půlvalný potenciál 2-AB na diamantovém filmu v průměru o 32 mV na jednotku pH a na skelném uhlíku o 45 mV na jednotku pH. V rozmezí pH 5,0 až 8,0 jsou půlvalné potenciály 2-AB na DFE posunuty o 50 mV oproti půlvalným potenciálům naměřeným na GCE. Maximálního signálu je dosaženo při pH mobilní fáze 5,0 (diamant) a 7,0 (skelný uhlík).

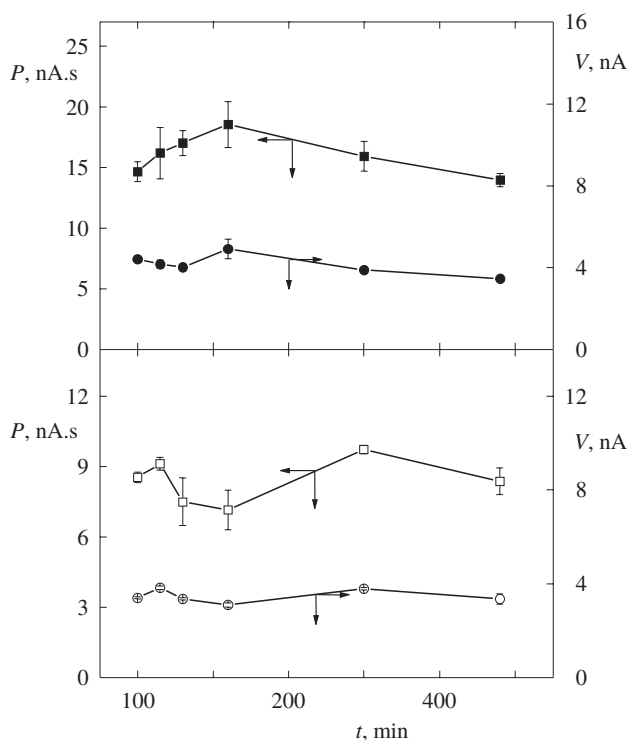
Stabilita signálu – opakovatelnost měření

Nezbytnou podmínkou pro praktické využití analytické metody je dostatečná opakovatelnost a časová stabilita signálu. Stabilita signálu v průtokovém systému s diamantovou indikační elektrodou byla srovnávána se stabilitou signálu v systému s elektrodou ze skelného uhlíku. K měření byl použit roztok 1-AN o koncentraci 1.10^{-7} mol.l⁻¹ připravený v mobilní fázi. Jako mobilní fáze byly vybrány ty, u nichž byl

pozorován nejvyšší signál analytu. Pro systém s DFE byla zvolena mobilní fáze methanol/fosfátový pufr pH 6,0 (1:1, v/v) a pro systém s GCE mobilní fáze methanol/fosfátový pufr pH 4,0 (1:1, v/v). Při průtoku 1 ml.min⁻¹ bylo ve zvolených časových intervalech 10× nastříkáváno 20 μl roztoku 1-AN do systému v režimu FIA. První série píků byla nastříknuta až po dostatečném ustálení základní linie, tj. zhruba po dvou hodinách od vložení napětí na elektrodový systém. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 2.

Během trvání experimentu (celkem 8 hodin) došlo k poklesu signálu 1-AN o 2 % u DFE a o 5 % u GCE. Tyto hodnoty jsou však vzhledem k relativní směrodatné odchylce nízké a lze říci, že nedochází ke statisticky významným změnám signálu. Průměrná relativní směrodatná odchylka z 10 nástřiků činila pro diamant 6,6 % z plochy a 2,5 % z výšky, pro skelný uhlík 7,7 % z plochy a 4,8 % z výšky. Celková relativní směrodatná odchylka vypočítaná ze všech nástřiků během experimentu byla pro diamant 12,7 % z plochy a 8,1 % z výšky, pro skelný uhlík 12,5 % z plochy a 12,2 % z výšky.

Pokud uvážíme velmi nízkou koncentraci analytu, použité experimentální zařízení a dlouhou dobu trvání tohoto experimentu, lze konstatovat dobrou stabilitu signálu 1-AN na obou



Obr. 2. Stabilita výšky (V) (●, ○) a plochy (P) (■, □) píku 1-aminonaftalenu na diamantové filmové elektrodě (○, □) a elektrodě ze skelného uhlíku (●, ■), podmínky měření jsou uvedeny v textu

typech elektrod. Ze vzájemného srovnání vychází lépe diamantová elektroda, vykazující nižší hodnoty relativních směrodatných odchylek.

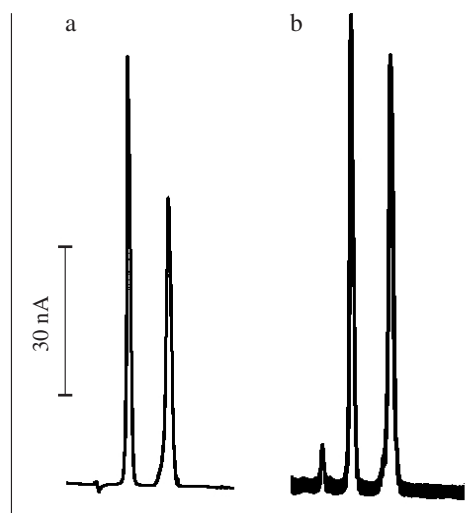
Tabulka II

Parametry kalibrační přímky a meze detekce 1-aminonaftalenu a 2-aminobifenyly

Analyt	Elektroda	R	Směrnice [mA.l.mol ⁻¹]	Úsek [nA]	Mez detekce [mol.l ⁻¹]
1-AN	DFE	0,9993	5,65±0,06	4,6±2,1	1,3.10 ⁻⁷
	GCE	0,9999	7,43±0,03	-0,1±1,2	6,4.10 ⁻⁷
2-AB	DFE	0,9981	3,17±0,05	5,9±1,9	1,2.10 ⁻⁷
	GCE	0,9955	4,49±0,13	10,5±5,3	8,2.10 ⁻⁷

SeparáčnÍ metoda a koncentračnÍ závislosti

Separace směsi 1-AN a 2-AB v reverzním chromatografickém systému na oktadecylové koloně Adsorbosphere HS C18 byla pozorována v mobilní fázi methanol/0,01 mol.l⁻¹ fosfátový pufr o pH 6,0 (3:7, v/v). Retenční časy při průtoku 1,5 ml.min⁻¹ byly pro 1-AN 2,1 min ($k = 0,75$) a pro 2-AB 3,5 min ($k = 1,90$). Vyšší šum základní linie u elektrody ze



Obr. 3. Chromatogram směsi 1-aminonaftalenu ($t_R = 2,1$ min) a 2-aminobifenyly ($t_R = 3,5$ min) naměřený pomocí diamantové filmové elektrody (a) a elektrody ze skelného uhlíku (b), podmínky měření jsou uvedeny v textu

skelného uhlíku při zhruba stejné velikosti signálu je dobře patrný z obr. 3.

Pro oba analyty byly proměřeny kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu 1.10^{-7} až 1.10^{-4} mol.l⁻¹. K amperometrické detekci byla použita jak DFE, tak GCE. Kalibrační závislosti byly lineární na obou elektrodách v celém měřeném koncentračním rozsahu. Korelační koeficienty lineární regrese jsou srovnatelné, citlivost (směrnice kalibrační závislosti) je vyšší pro GCE (tab. II). Mez detekce byla spočítána jako koncentrace poskytující signál rovný trojnásobku absolutní hodnoty šumu. Díky podstatně nižším hodnotám šumu je mez detekce $5 \times$ až $7 \times$ nižší na diamantové filmové elektrodě.

Autoři děkují za finanční podporu Grantové agentuře Univerzity Karlovy (grant č. 253/2001/B-CH/PrF).

LITERATURA

- McCreery R. L., v knize: *Electroanalytical Chemistry* (Bard A. J., ed.), sv. 17. Marcel Dekker, New York 1991.
- Kneten K. R., McCreery R. L.: *Anal. Chem.* 64, 2518 (1992).
- Chen P., Fryling M. A., McCreery R. L.: *Anal. Chem.* 67, 3115 (1995).
- Iwaki M., Sato S., Takahashi K., Sakairi H.: *Nucl. Instrum. Methods* 209, 1129 (1983).
- Pleskov Y., Sakharova A., Krotova M. D., Bouilov L., Spitsyn B. V.: *J. Electroanal. Chem.* 228, 19 (1987).
- Xu J., Granger M. C., Chen Q., Strojek J. W., Lister T. E., Swain G. M.: *Anal. Chem.* 69, 591A (1997).
- Swain G. M., Anderson A. B., Angus J. C.: *MRS Bulletin* 23, 56 (1998).
- Granger M. C., Xu J., Strojek J. W., Swain G. M.: *Anal. Chim. Acta* 397, 145 (1999).
- Dennison J. R., Holtz M. W., Swain G. M.: *Spectroscopy* 10, 38 (1996).

10. Granger M. C., Witek M., Xu J., Wang J., Hupert M., Hanks A., Koppang M. D., Butler J. E., Lucazeau G., Mermoux M., Strojek J. W., Swain G. M.: *Anal. Chem.* **72**, 3793 (2000).
11. Otagawa T., Stetter J. R., Zaromb S.: *J. Chromatogr.* **360**, 252 (1986).
12. Varney M. S., Preston M. R.: *J. Chromatogr.* **348**, 265 (1985).
13. Felice L. J., Schirmer R. E., Springer D. L., Veverka C. V.: *J. Chromatogr.* **354**, 442 (1986).
14. Olek M.: *J. Chromatogr.* **447**, 421 (1988).
15. Koppang M. D., Witek M., Blau J., Swain G. M.: *Anal. Chem.* **71**, 1188 (1999).
16. Xu J., Swain G. M., Ononye A. I.: nepublikované výsledky (1999).
17. Sarada B. V., Rao T. N., Tryk D. A., Fujishima A.: *Chem. Lett.* **11**, 1213 (1999).

J. Cvačka^a, G. M. Swain^b, J. Barek^c, and J. Zima^c
(^a*Department of Natural Products, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Department of Chemistry, Michigan State*

University, Lansing, U.S.A., ^c*UNESCO Laboratory of Environmental Electrochemistry, Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague*): **Determination of Aminonaphthalenes and Aminobiphenyls by Liquid Chromatography with Amperometric Detection on Diamond-Film Electrode**

An amperometric detector with a diamond-film working electrode was tested for the determination of 1-aminonaphthalene and 2-aminobiphenyl by liquid chromatography. The noise, background current, signal stability, linearity of calibration curve and detection limits were compared with the parameters obtained using classic glassy carbon electrode. The signal of analytes was reproducible and stable at least for 8 h for both electrode materials. Calibration curves were linear in the whole range (10^{-7} – 10^{-4} mol.l⁻¹) and the sensitivity was higher for the glassy carbon electrode. Both the background current and noise were substantially lower on the diamond-film electrode. As a result, the detection limits of analytes (1×10^{-7} mol.l⁻¹ for both analytes) were 5–7 times lower for the diamond-film electrode.

STANOVENÍ FENOLICKÝCH LÁTEK V ROSTLINNÉM MATERIÁLU KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU A KAPALINOVOU CHROMATOGRAPHIÍ

JIŘÍ VLČEK, BOŘIVOJ KLEJDUS
a VLASTIMIL KUBÁŇ^{*}

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická
univerzita, Zemědělská 1, 613 00 Brno
e-mail: kuban@mendelu.cz

Došlo dne 15.VIII.2001

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, kapalinová chromatografie, rostlinný materiál, fenolické látky, vanilin, kyselina kávová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina ferulová, kyselina salicylová, kyselina protokatechová, kyselina *p*-kumarová

Úvod

Současný zvýšený zájem o allelochemikálie^{1,2} je vysvětlitelný možností použití těchto chemických látek přírodní povahy jako ekologičtější alternativy dnes hojně využívaných syntetických prostředků sloužících k ovlivnění růstových fází rostliny či k její ochraně před napadením škůdci nebo plevely. Mimo oblast agronomie najdou látky s allelopatickými vlastnostmi využití i v mnoha jiných oborech, jako je medicína, farmacie, potravinářství, biologie atp.

Velkou část allelochemikálií³ tvoří fenolické látky, jejichž významnou skupinou jsou fenolkarboxylové kyseliny a jejich deriváty. Účinky fenolkarboxylových kyselin na rostlinu jsou velice rozdílné v závislosti na koncentraci a druhu sloučeniny. Stejná látka může v rozdílných koncentracích proces aktivovat i inhibovat. Obsah fenolických látek v rostlinném materiálu je závislý na mnoha faktorech. Koncentrace fenolických látek je dána rostlinným druhem, vývojovou fází rostliny, ročním obdobím, polohou vůči okolním rostlinám, stupněm poškození atd. Vhodná a citlivá analytická separační metoda nám umožňuje sledovat závislost obsahu fenolických látek na některém ze zvolených faktorů.

Pro sledování funkce a účinků fenolických látek již není dostačující stanovení celkového obsahu fenolických látek, nýbrž je nutné určit koncentraci jednotlivých fenolických sloučenin a jejich úlohu. Tento úkol je splnitelný za použití moderních analytických separačních metod. V literatuře popsané elektroforetické separace podobných skupin látek fenolické povahy ve vzorcích s jednoduchou maticí nejčastěji používají metody zónové elektroforézy⁴⁻⁶ (CE) a micelární elektrokinetické chromatografie^{7,8} (MEKC). Jako základní elektrolyt je nejvíce používán pufr boritanový, fosforečnanový, uhličitanový, nebo jejich směsi⁹⁻¹². V metodách MEKC se jako aditivum přidává natrium-dodecyl-sulfát (SDS), hexa-

decyl(trimethyl)amonium-bromid (CTAB) a hexadimethrin-bromid^{13,14} (HDB). Doposud se však k separaci a stanovení fenolických látek nejčastěji používá klasické metody kapalinové chromatografie^{5,15,16}.

Úkolem této práce bylo ukázat, že stejný úkol může být vyřešen i za použití kapilární elektroforézy s vysokým rozlišením. Metoda CE byla optimalizována pro rozdělení vybrané skupiny sedmi rostlinných fenolických látek (vanilinu, ferulové, *p*-kumarové, *p*-hydroxybenzoové, salicylové, kávové a protokatechové kyseliny), u kterých byl předpokládán výrazný allelopatický účinek.

Experimentální část

Pro elektroforetickou separaci, identifikaci a stanovení vybraných fenolických sloučenin byly používány přístroje Beckman P/ACE System 5510 ovládaný programem Gold (Beckman Instruments, Fullerton, USA) a HP^{3D} CE Instrument ovládaný programem ChemStation (Hewlett Packard, Analytical Division B4, Waldbronn, Německo). Oba přístroje byly vybaveny detektory s diodovým polem, kterými byla měřena absorpční spektra v rozsahu 190–400 nm na počátku, ve vrcholu a na konci každého píku. Pro dávkování vzorků bylo použito hydrodynamické dávkování vakuem (přístroj Hewlett Packard) nebo tlakem plynu (přístroj Beckman), které pro daný typ vzorků zajišťovalo dobrou reprodukovatelnost dávkovaného množství vzorku.

Separace probíhala při napětí 6 kV v nepotažené křemenné kapiláře Supelco-Select – FS75 o délce 31 cm (efektivní délka 22 cm), vnitřním průměru 75 μm a vnějším průměru 363 μm naplněné základním elektrolytem složeném z 20 mmol.l^{-1} kyseliny borité a 60 mmol.l^{-1} hydrogenfosforečnanu sodného o pH 8,75. Před prvním použitím byla kapilára iniciována nejprve propláchnutím 0,1 mol.l^{-1} roztokem kyseliny chlorovodíkové, vodou, 0,1 mol.l^{-1} roztokem hydroxidu sodného a opět vodou, každou látkou vždy po dobu 20 minut. Stejný postup, se zkrácenou dobou jednotlivých průplachů na 5 minut, se opakoval na začátku každého dne měření. Mezi jednotlivými separacemi byla kapilára před nástikem vzorku proplachována roztokem základního elektrolytu a po skončení separace vodou. Doba obou těchto průplachů byla 5 minut. V případě výskytu nežádoucích paměťových efektů se tyto obvyklé doby, které vyhovovaly pro většinu analyzovaných vzorků, aktuálně prodlužovaly.

Základní elektrolyt byl připraven rozpuštěním odváženého množství kyseliny borité a hydrogenfosforečnanu nebo dihydrogenfosforečnanu sodného (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko) v deionizované vodě (AquaDem 2, Tišnov, ČR) dočištěné systémem Millipore Milli-Q RG (Millipore, Bedford, USA). Požadované pH elektrolytu bylo nastaveno roztokem hydroxidu sodného (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko).

Pro CE byly základní roztoky standardů vanilinu, kávové, *p*-hydroxybenzoové (Fluka Chemie AG, Buchs, Švýcarsko), ferulové, salicylové, protokatechové (Serva Feinbiochemica, Heidelberg/New York) a *p*-kumarové kyseliny (Sigma Chemical Comp., St. Louis, USA) připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství standardu v methanolu (Merck KGaA,

* Autor pro korespondenci

Darmstadt, Německo) a doplněny vodou. Roztoky standardů a základního elektrolytu byly filtrovány membránovým filtrem s průměrem 47 mm a velikostí pórů 0,45 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a byly uchovávány v lednici.

HPLC separační systém Hewlett Packard model HP 1100 (Wilmington, USA) s detektorem s diodovým polem používal kolonu Zorbax SB C₁₈ Rapid ResolutionTM (75 × 4,6 mm i.d., velikost částic 3,5 μm). Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5 % (v/v) octové kyseliny. Pro separaci bylo použito lineárního gradientu od 5:95 až na 30:70 (v/v) za 12,5 minuty a průtoku 0,3 ml.min⁻¹. Kolona byla temperována na teplotu 30 °C. Detekce byla prováděna při 280 nm. Absorpční spektra byla snímána ve vrcholu, patách a obou inflexních bodech každého píku v rozsahu 190–400 nm.

Pro přípravu vzorků a mobilní fáze byla použita rozpouštědla a chemikálie Merck (Darmstadt, Německo). Zásobní standardní roztoky fenolických látek o koncentraci 10 mg.l⁻¹ byly připraveny ve směsi voda–methanol (30:70, v/v). Pracovní roztoky standardů požadované koncentrace byly připravovány denně ředěním zásobních standardních roztoků vodou.

Vzorky suchých rostlin (pryskyřník cibulkový *Ranunculus bulbosus* – 8001, rozrazil rozekvítek *Veronica chamaedrys* – 8010 a krvavec menší *Sanguisorba minor* – 8012) a obilek ječmene (odruža Akcent v různém stupni zralosti) byly nejdříve jemně rozemlety na tříštivém mlýnku TZ 8017 (Oseva, Technický provoz n. p., Litomyšl, ČR). Navážka 0,5 g suché travní hmoty (1,75 g obilek ječmene) byla hydrolyzována 40 (50) ml 1 M-HCl pod refluxem po dobu jedné hodiny. Extrakt byl zfiltrován a doplněn na objem 50 ml. Alikvótní část 25 ml byla opakovaně (3×15 ml) extrahována diethyletherem (u suchých rostlin) nebo ethylacetátem (u obilek ječmene). Spojené organické frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným a do sucha odpařeny na vakuové odparce při teplotě 38±2 °C. Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml směsi methanol–voda (1:1, v/v) pro CE separaci, nebo v roztoku mobilní fáze pro HPLC. Vzniklý roztok byl před nadávkováním filtrován jednorázovými filtry o průměru 13 mm a velikosti pórů 0,45 μm (MetaChem, Torrance, USA).

Při přípravě vzorků bylo použito rotační vakuové odparky Model 350 (Unipan, Polsko) a ultrazvukové lázně (Cole – Parmer Instrument Comp., Chicago, USA). Kontrola pH základního elektrolytu byla prováděna na pH metru PHM 64 se skleněnou elektrodou G 202B a nasycenou kalomelovou elektrodou K 401 (vše Radiometer, Copenhagen, Dánsko). Kalibrace pH metru se prováděla denně standardními tlumivými roztoky o pH 7,00 a 9,18 (±0,01) při 25 °C (Radiometer, Copenhagen, Dánsko). Pro tlakové dávkování a proplachování kapiláry byly přístroje připojeny centrálním rozvodem na generátor dusíku Nitrobox N5 (Italfilo Energieering s. r. l., Grosseto, Itálie).

Knihovna spekter separovaných látek

Použití detekce pomocí detektoru s diodovým polem umožnilo identifikaci jednotlivých fenolických látek ve vzorku nejen podle migračních a retenčních časů, ale i vyhodnocením jejich absorpčních spekter. Pro tento účel bylo nutné vytvořit knihovnu absorpčních spekter vybraných fenolických látek, jejichž přítomnost byla v rostlinném materiálu předpokládána. Spektra standardních látek byla získána proměření standardních roztoků, vzniklých rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml

methanolu a doplněním na 5 ml vodou, při optimálních experimentálních podmínkách. Spektra jednotlivých analytů vzorku byla srovnávána s odpovídajícími spektry ve spektrální knihovně a shoda byla posouzena za použití hodnoty tzv. faktoru shody (match factor, identická spektra mají faktor shody 1000). Hodnoty faktoru shody se při stanovení vzorků ječmenů a travin pohybovaly v rozmezí 995–999.

Výsledky a diskuse

Optimalizace složení a vlastností základního elektrolytu

První fází vývoje elektroforetické separační metody bylo stanovení nejvýhodnějších vlastností základního elektrolytu pro dělení vybrané skupiny fenolických látek s předpokládanými allelopatickými vlastnostmi.

Modelová směs sedmi fenolických látek (vanilin, kávová, *p*-hydroxybenzoová, ferulová, salicylová, protokatechová a *p*-kumarová kyseliny) byla separována za použití uhličitánového tlumivého roztoku, tlumivého roztoku boritan/fosforečnanového a tlumivého roztoku boritan/fosforečnanového s přídavkem SDS nebo CTAB (1–60 mmol.l⁻¹). Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při použití směsi boritan-fosforečnan. Přídavek aditiv do roztoku tlumiče nevedl ke zvýšení rozlišení. Proto byl jako základní elektrolyt zvolen tlumivý roztok složený z kyseliny borité a dihydrogenfosforečnanu sodného.

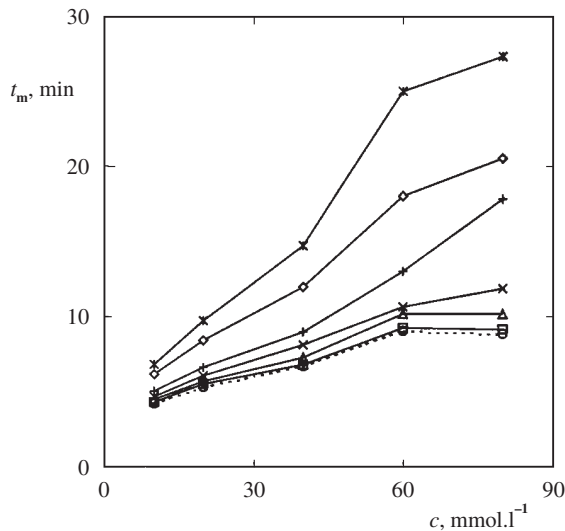
Prvním krokem byla optimalizace poměru a koncentrace jednotlivých složek pufru. Byla testována koncentrace kyseliny borité v rozsahu 5 až 40 mmol.l⁻¹ a fosforečnanu v rozsahu 20 až 80 mmol.l⁻¹, pH roztoků bylo udržováno na konstantní hodnotě. Optimální separace a délka analýzy odpovídala pufru složenému z 20 mmol.l⁻¹ kyseliny borité a 60 nebo 40 mmol.l⁻¹ dihydrogenfosforečnanu sodného. Změny migračních časů jednotlivých látek s měnícím se složením základního elektrolytu použitého k separaci jsou shrnuty v obrázcích 1 a 2. Při separaci modelové směsi standardů byl dostačující rozdíl pohyblivosti analytů odpovídající elektrolytu s koncentrací fosforečnanu 40 mmol.l⁻¹. Pro separaci reálných vzorků, kdy se v elektroforegramu objevují píky dalších podobných látek, byly vhodnější větší rozdíly migračních časů dosahované při použití pufru s 60 mmol.l⁻¹ fosforečnanu.

Další veličinou, která zásadním způsobem ovlivňuje kvalitu separace, je pH základního elektrolytu. Zásobní roztok základního elektrolytu kyseliny borité a dihydrogenfosforečnanu sodného byl za míchání magnetickou míchačkou titrován roztokem hydroxidu sodného na požadovanou hodnotu pH. V této fázi byla hodnota pH z neutrální postupně zvyšována s krokem 0,25 jednotky pH. Pro separaci se jako optimální ukázala hodnota pH 8,75. Při nižších hodnotách docházelo k nedostatečné separaci, vyšší hodnoty vedly k velkému nárůstu doby separace. Vzhledem k optimální hodnotě pH základního elektrolytu byl při další práci tento elektrolyt připravován z kyseliny borité a hydrogenfosforečnanu sodného, čímž se zmenšilo množství hydroxidu sodného potřebného pro nastavení pH. Vliv měnícího se pH na migrační časy jednotlivých látek je shrnut v obr. 3.

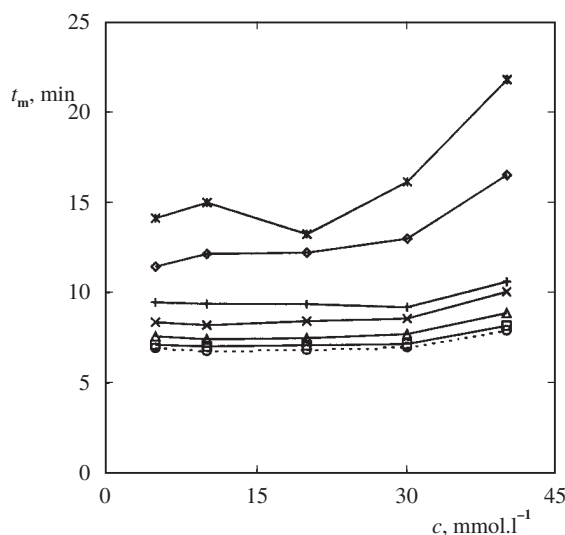
Separace probíhala za konstantního napětí 6 kV. Při tomto napětí dosahoval elektrický proud procházející kapilárou hodnoty 90 μA . Zvyšování separačního napětí vedlo ke zmenšení

rozdílů migračních časů separovaných látek, a tím i ke zhoršení kvality separace (obr. 4).

Separace probíhala v kapiláře, která byla v průběhu měření termostátována. Teplota separační kapiláry ovlivňuje rychlost migrace analytů, která se s nárůstem teploty zvyšuje. Dále s rostoucí teplotou dochází k rozšíření píků a klesá jejich



Obr. 1. Závislost migračního času (t_m) na koncentraci (c) fosforečnanu v základním elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); separace při napětí 6 kV v křemenné kapiláře o celkové délce 31 cm (efektivní délka 22 cm) a vnitřním průměru 75 μm naplněné základním elektrolytem 20 mmol.l⁻¹ kyselina boritá a 60 mmol.l⁻¹ dihydrogenfosforečnan sodný o pH 8,75



Obr. 2. Závislost migračního času (t_m) na koncentraci (c) boritanu v základním elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); experimentální podmínky viz obr. 1

symetrie, což vede ke snížení rozlišení píků. Modelová směs byla separována při teplotách 25, 30, 35 a 40 °C. Pro analýzu byla jako nejvhodnější zvolena teplota 25 °C.

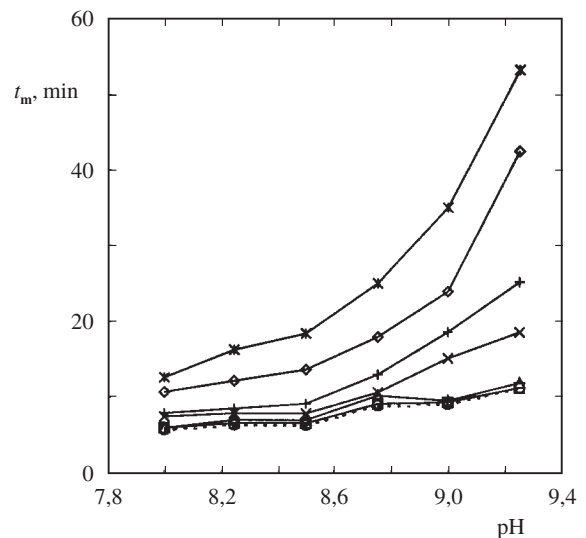
K získání kalibračních závislostí jednotlivých fenolických látek byly použity roztoky standardů o koncentraci 0,2; 2,0; 20,0 a 40,0 μg.ml⁻¹, kde každá ze čtyř použitých koncentrací jednotlivých standardů byla nezávisle proměřena třikrát. Pro měření kalibračních závislostí byla použita vlnová délka 254 nm (reference 450 nm), která vyhovovala většině standardů. Korelační koeficient kalibračních závislostí byl ve všech případech vyšší než 0,999.

Vzhledem k matici jednotlivých vzorků bylo možné obsah jednotlivých fenolických látek stanovit metodou kalibračních křivek. Meze detekce (LOD) a relativní směrodatné od-

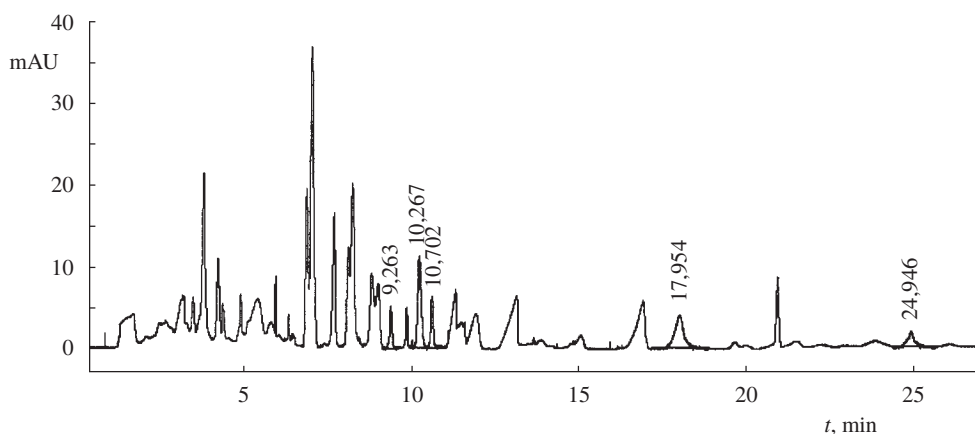
Tabulka I

Migrační časy (t_m), meze detekce (LOD) stanovené z trojnásobku maximálního kolísání základní linie slepého pokusu ($3 \times h_{\max}$) a relativní směrodatné odchylky měření (RSD), určené ze tří nezávislých opakování při koncentraci 2 μg.ml⁻¹ každé z elektroforeticky stanovovaných fenolických látek; podmínky CE separace viz obr. 1

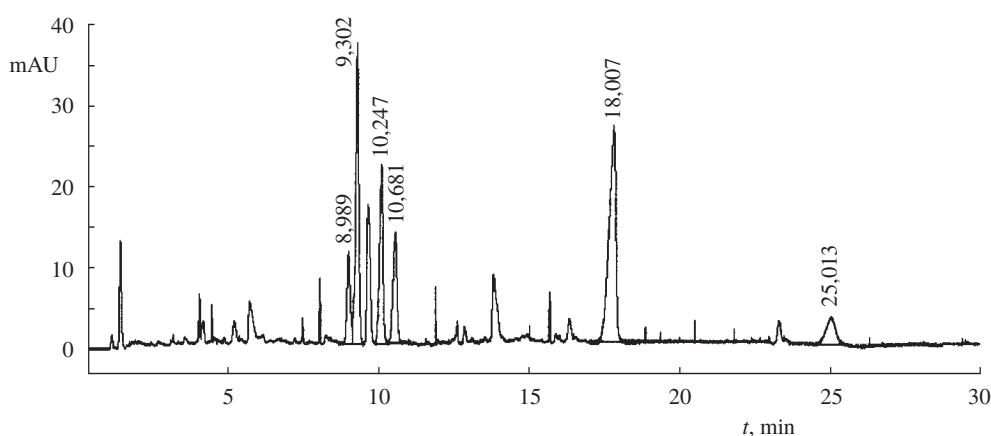
Analyt	t_m [min]	LOD [mg.ml ⁻¹]	RSD [%]
Vanilin	9,09	0,18	2,3
Kyseliny			
ferulová	9,27	0,16	2,5
<i>p</i> -kumarová	10,25	0,10	2,4
<i>p</i> -hydroxybenzoová	10,67	0,10	3,5
salicylová	13,04	0,51	3,0
kávová	17,98	0,13	6,0
protokatechová	25,00	0,15	6,4



Obr. 3. Závislost migračního času (t_m) na pH základního elektrolytu (○ vanilin, □ ferulová kyselina, Δ *p*-kumarová kyselina, × *p*-hydroxybenzoová kyselina, ◇ kávová kyselina, * protokatechová kyselina, + salicylová kyselina); experimentální podmínky viz obr. 1



Obr. 4. **Elektroforegram stanovení fenolických látek CE** (ferulová kyselina – 9,263 min, *p*-kumarová kyselina – 10,267 min, *p*-hydroxybenzoová kyselina – 10,702 min, kávová kyselina – 17,954 min, protokatechová kyselina – 24,946 min) ve vzorku 8010 rozrazil rozekvítek *Veronica chamaedrys*; experimentální podmínky viz obr. 1



Obr. 5. **Elektroforegram stanovení fenolických látek CE** (vanilin – 8,989 min, ferulová kyselina – 9,302 min, *p*-kumarová kyselina – 10,247 min, *p*-hydroxybenzoová kyselina – 10,681 min, kávová kyselina – 18,007 min, protokatechová kyselina 25,013 min) ve vzorku AII – obilky ječmene odrůdy Akcent; experimentální podmínky viz obr. 1

chytky měření (RSD), určené ze tří nezávislých opakování při koncentraci $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ každé ze stanovovaných fenolických látek jsou shrnuty v tabulce I a doplněny migračním časem. Meze detekce za podmínek zvolených pro stanovení vybraných fenolických látek byly stanoveny z trojnásobku maximálního kolísání základní linie slepého pokusu ($3 \times h_{\text{max}}$).

Stanovení obsahu vybraných rostlinných fenolických látek metodami CE a HPLC

Analýza reálných rostlinných materiálů s sebou přináší problém složité matrice obsahující velké množství látek s podobnými vlastnostmi, a tím i velice podobnými, nebo dokonce totožnými, migračními časy, jako mají hledané analyty. Další problém přináší skutečnost, že se stanovované fenolické látky nenacházejí jako volné, ale mohou být v rostlině přítomny v různých konjugovaných formách. Proto, aby byla analýza vůbec možná, je nutné oddělit analyty od osnovy a izolovat je z požadovaných konjugovaných forem.

Vhodné podmínky separace, získané optimalizací elektroforetického systému pro rozdělení modelové směsi fenolických sloučenin, byly použity pro stanovení fenolických látek s allelopatickými vlastnostmi ve vzorcích suché travní hmoty a obilky ječmene.

Ve třech vzorcích suché travní hmoty a čtyřech vzorcích obilky ječmene, připravených k analýze výše popsaným způsobem, byla stanovena vybraná skupina fenolických sloučenin s allelopatickými vlastnostmi výše popsanou metodou kapilární elektroforézy s vysokým rozlišením.

Elektroforetický systém byl nastaven na ideální podmínky separace, stanovené na modelové směsi standardních roztoků. Na elektroforegramu vzorků se na rozdíl od modelové směsi vyskytly i píky dalších v rostlině obsažených látek (obr. 4 a 5). Proto byl ke stanovení fenolických látek v reálných vzorcích jako základní elektrolyt zvolen pufr s $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ fosforečnanu, při jehož použití se více lišily migrační časy stanovovaných látek. Metodou HPCE dosažené výsledky byly srovnány s výsledky stanovenými metodou HPLC. Stanovení HPLC probíhalo za podmínek popsaných v literatuře¹⁵ na ko-

Tabulka II

Množství fenolických látek [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] stanovená metodou CE v jednotlivých vzorcích travin (pryskyřník cibulkový *Ranunculus bulbosus* – 8001, rozrazil rozekvitek *Veronica chamaedrys* – 8010 a krvavec menší *Sanguisorba minor* – 8012) a obilek ječmene (odrůda Akcent v různém stupni zralosti) spolu se srovnávacími hodnotami získanými HPLC; podmínky separace CE viz obr. 1; mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a 0,5 % (v/v) kyseliny octové, byl použit lineární gradient od 5:95 až na 30:70 (v/v) za 12,5 minuty a průtok $0,3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; kolona byla temperována na teplotu $30\text{ }^{\circ}\text{C}$

Metoda	Vzorek	Vanilin	Kyseliny				
			ferulová	<i>p</i> -kumarová	<i>p</i> -hydroxybenzoová	kávová	protokatechová
<i>Trávy</i>							
HPCE	8001	0,20±0,02	0,28±0,01	0,19±0,02	–	0,82±0,03	1,42±0,03
	8010	–	0,32±0,03	1,41±0,02	0,29±0,04	1,24±0,05	0,28±0,02
	8012	–	0,29±0,01	0,20±0,02	0,31±0,02	0,70±0,03	–
HPLC	8001	0,22±0,02	0,34±0,01	0,20±0,02	0,14±0,02	0,74±0,02	1,33±0,03
	8010	0,04±0,01	0,26±0,02	1,47±0,02	0,38±0,01	1,16±0,03	0,24±0,01
	8012	0,15±0,02	0,31±0,01	0,21±0,01	0,27±0,02	0,70±0,01	0,13±0,01
<i>Ječmeny</i>							
HPCE	A I	5,03±0,16	18,95±0,15	7,21±0,07	1,21±0,05	1,93±0,07	7,82±0,05
	A II	3,27±0,07	10,69±0,04	4,05±0,10	2,47±0,04	5,84±0,06	1,06±0,03
	A III	5,52±0,12	28,01±0,16	10,52±0,02	8,60±0,12	1,80±0,07	3,85±0,04
	A IV	3,64±0,06	27,54±0,10	11,11±0,06	7,08±0,08	1,83±0,01	3,27±0,02
HPLC	A I	4,96±0,12	19,49±0,10	7,24±0,07	1,29±0,06	1,82±0,06	7,69±0,05
	A II	3,23±0,08	10,61±0,09	3,89±0,04	2,45±0,05	5,81±0,04	1,22±0,03
	A III	5,45±0,06	28,15±0,05	10,65±0,06	8,56±0,07	1,74±0,06	3,70±0,05
	A IV	3,75±0,05	27,35±0,05	11,05±0,07	7,19±0,06	1,75±0,04	3,21±0,04

loně ZORBAX SB C₁₈ bez použití v literatuře popsané SPE předseparace. Příprava vzorků pro HPLC i CE byla totožná, lišila se pouze v poslední fázi, kdy pro nástřik do HPLC byl suchý odpárek rozpuštěn v roztoku použité mobilní fáze.

Množství fenolických látek stanovená kapilární elektroforézou v jednotlivých vzorcích travin a obilek ječmene jsou shrnuta v tabulce II spolu se srovnávacími hodnotami získanými HPLC. Výsledky měření koncentrace fenolických látek (vanilin, ferulová, *p*-kumarová, *p*-hydroxybenzoová, kávová a protokatechová kyseliny) ukazují na rozdíly v obsahu fenolických látek v závislosti na rostlinném druhu ve vzorcích sušených rostlin pryskyřníku, rozrazilu a krvavce. Vzorky různě zralých obilek ječmene Akcent demonstrují změnu obsahu v odlišných růstových fázích rostliny.

Závěr

Práce popisuje dostatečně rychlou (celková doba separace a stanovení, včetně pre- a postkondicionace – 35 min) a citlivou CE metodu stanovení a identifikace skupiny látek s allelopatickými vlastnostmi v rostlinném materiálu. LOD jednotlivých analytů leží v rozmezí $0,10\text{--}0,51\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (trojnásobek maximálního kolísání základní linie slepého pokusu $3\times h_{\text{max}}$). Metoda je použitelná jako alternativní možnost ke stanovení klasickou chromatografickou metodou. Výsledky ukazují na velmi dobrou shodu obsahů získaných měřeními metodami CE a kapalinové chromatografie.

Analýza rostlinného materiálu s sebou vždy přináší kom-

plikace v podobě složité matrice vzorku, lišící se vzorek od vzorku, která obsahuje velké množství interferujících látek velice podobných vlastností. Metoda CE umožnila stanovení hodnot koncentrace analytů ve vzorcích travin i ječmene. Přítomnost vysoké koncentrace neidentifikované látky s velice blízkým migračním časem ve složité matrici vzorků travin znemožnila stanovení některých analytů (kyseliny protokatechové a vanilinu v krvavci, kyseliny *p*-hydroxybenzoové v pryskyřníku a vanilinu v rozrazilu).

Problematika byla řešena v rámci výzkumného záměru MŠMT ČR, reg. č. MSM 432100001 a grantu GA ČR reg. č. 521/99/0863.

LITERATURA

1. Klejdus B., Kubáň V.: Chem. Listy 93, 243 (1999).
2. Inderjit, Dakshini K. M. M., Einheling F. A.: *Allelopathy, Organisms, Processes and Applications*, ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington, 1995.
3. Rice E. L.: *Allelopathy*. Academic Press, Orlando 1984.
4. Carcia-Viguera C., Bridle P.: Food Chem. 54, 349 (1995).
5. Andrade P. B., Oliveira B. M., Seabra R. M., Ferreira M. A., Ferreres F., Garcia-Viguera C.: Electrophoresis 22, 1568 (2001).
6. Ramos R., Andrade P. B., Seabra R. M., Pereira C., Ferreira M. A., Faia M. A.: Food Chem. 67, 39 (1999).

7. Rodriguez-Delgado M. A., Perez J. P., Sanchez M. J., Montelongo F. J. G.: *Chromatographia* 52, 289 (2000).
8. Issaq H. J.: *Electrophoresis* 20, 3190 (1999).
9. Masselter S., Zemann A., Bobleter O.: *Chromatographia* 40, 51 (1995).
10. Park S., Lunte S. M., Lunte C. E.: *Anal. Chem.* 67, 911 (1995).
11. Rodriguez-Delgado M. A., Perez M. L., Corbella R., Gonzalez G., Montelongo F. J. G.: *J. Chromatogr., A* 871, 427 (2000).
12. Kulomaa A., Siren H., Riekkola M. L.: *J. Chromatogr., A* 781, 523 (1997).
13. Masselter S. M., Zemann A. J.: *Anal. Chem.* 67, 1047 (1995).
14. Watanabe T., Yamamoto A., Nagai S., Terabe S.: *J. Chromatogr., A* 793, 409 (1998).
15. Klejdus B., Kubáň V.: *Phytochem. Anal.* 11, 375 (2000).
16. Amakura Y., Okada M., Tsuji S.: *J. Chromatogr., A* 891, 183 (2000).

J. Vlček, B. Klejdus, and V. Kubáň (*Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno*): **Determination of Phenolic Substances in Plant Materials by Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography**

A simple, sensitive and fast capillary electrophoretic method was optimized for the identification and determination of allelopathic phenolic compounds (vanillin, caffeic, 4-hydroxybenzoic, ferulic, salicylic, protocatechuic and 4-coumaric acids) in plant materials. Separation in an uncoated silica capillary (Supelco Select – FS75, effective length 22 cm, total length 31 cm, 75 μm I.D., 363 μm O.D.) was performed at 6 kV in 20 mmol.l^{-1} boric acid and 60 mmol.l^{-1} Na_2HPO_4 buffer (pH 8.75). The method was applied to the determination of vanillin, 4-hydroxybenzoic and protocatechuic acids in *Ranunculus bulbosus*, *Veronica chamaedrys* and *Sanguisorba minor* and in barley seeds. The results were in good agreement with those obtained by liquid chromatography.