

ROZLIŠENIE IZOMÉRNÝCH ZLÚČENÍN POMOCOU VÁKUOVÉHO UV DETEKTORA

LUDOVÍT ŠKULTÉTY, TOMÁŠ PLUHÁČEK
a VLADIMÍR HAVLÍČEK

Mikrobiologický ústav AV ČR, Videňská 1083, 142 20
Praha 4
ludovit.skultety@biomed.cas.cz

Došlo 12.2.20, prijaté 17.2.20.

Kľúčové slová: vákuový ultrafialový detektor, rozlíšenie, izomér, koelucia

Obsah

1. Úvod
2. Stolný vákuový ultrafialový detektor (VUV)
3. Kvantitatívna analýza analytov pomocou VUV detekcie
4. Dekonvolúcia koelujúcich analytov v plynovej chromatografii
5. Aplikačné možnosti GC-VUV
 - 5.1. Analýzy ropných látok
 - 5.2. Potraviny a potravinárske arómy
 - 5.3. Analýza látok prítomných v živých systémoch
 - 5.4. Forenzné analýzy
 - 5.5. Životné prostredie
 - 5.6. Iné aplikácie VUV detekcie
6. Záver

1. Úvod

Plynová chromatografia (GC) je široko rozšírenou a vysoko spoľahlivou separačnou technikou na analýzu zložitých zmesí prchavých a poloprchavých zlúčenín. Nespočetné množstvo dostupných chromatografických separačných mechanizmov, techník vstrekovania, či detektorov umožnilo vyriešiť mnohé analytické výzvy v environmentálnom, energetickom, potravinárskom, farmaceutickom, či medicínskom výskume. GC v kombinácii s hmotnostno-spektrometrickou detekciou (GC-MS) je v súčasnosti najširšie používanou technikou, pokiaľ ide o univerzálnosť detekcie, dosiahnuté medze detekcie a stanovenia, či schopnosť kvalitatívnej identifikácie chemických zlúčenín. Práve preto je obrovské množstvo akreditovaných, či štandardizovaných metód založených na GC-MS aplikáciách. Avšak aj táto technika má určité obmedzenia. GC-MS nie je vhodná na analýzu izomérnych,

izobarických, malých, či labilných chemických zlúčenín. Ich rozpoznanie skôr závisí od účinnosti chromatografickej separácie, ktorá často dokáže poskytnúť dostatočné rozlíšenie iba za použitia špeciálnych (a teda aj ekonomicky veľmi náročných) stacionárnych, či mobilných fáz.

S cieľom eliminovať niektoré známe limity MS detekcie a poskytnúť nové aplikačné možnosti separačnej techniky GC sa v roku 1987 podarilo skombinovať UV detektor s vlnovou dĺžkou v ďalekej ultrafialovej oblasti (z ang. far UV detector, FUV) a kapilárnu GC (cit.¹). Toto zariadenie ale umožňovalo len meranie absorbcie pri vlnovej dĺžke 122 nm (10,2 eV). To síce postačovalo na detekciu širokej škály chemických zlúčenín, vrátane alkánov, ale nedokázalo poskytnúť žiadne nové kvalitatívne informácie. Preto autori otestovali aj kombináciu s fotoionizačným detektorom (photoionization detector, PID), ktorý sa stal komerčne dostupný v roku 1976. PID pri vyššej energii (106 nm; 11,7 eV) vykazoval menšie rušenie bežnými zlúčeninami, ako napr. voda, v porovnaní s FUV (10,2 eV). Následné detailné porovnanie FUV a PID detektorov tento poznatok potvrdilo². Širokopásmové UV absorpčné zariadenie, schopné kvantitatívnej a kvalitatívnej analýzy, bolo však predstavené až v roku 2000 (cit.^{3,4}). Tento GC-UV systém umožnil úplný sken (v rozsahu vlnových dĺžok 168–330 nm) eluovaných látok a na základe jedinečných absorpčných spektier v plynnej fáze zabezpečil identifikáciu rôznych aromatických a heteroatómy obsahujúcich látok. V dôsledku slabej priepustnosti svetla pri krátkych vlnových dĺžkach (168 až 180 nm) však nedokázal ponúknuť univerzálnu detekčnú schopnosť.

2. Stolný vákuový ultrafialový detektor (VUV)

Historicky bolo meranie UV absorpčných spektier možné iba za pomoci elektromagnetického žiarenia pochádzajúceho zo synchrotronového urýchľovača. Takýto vysoko intenzívny zdroj svetla bol potrebný na prekonanie absorpčného pozadia analytov. V podstate každá chemická zlúčenina totiž silno absorbuje v spektrálnom rozsahu 115–185 nm. Fotóny sú v tejto oblasti schopné excitovať $\pi \rightarrow \pi^*$ a $n \rightarrow \pi^*$ elektronické prechody, ale aj vysokoenergetické prechody $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, ktoré zvyčajne nie je možné analyzovať klasickou UV-VIS absorpčnou spektroskopiou. To sa však zmenilo vývojom VUV detektora, využívajúceho ako zdroj svetla deutériovú lampu, ktorý sa stal komerčne dostupný v roku 2014 (cit.⁵). Ide o všestranný spektroskopický detektor, ktorý môže byť spojený s akýmkoľvek štandardným GC zariadením. Hoci má detektor v názve „vákuový“, zariadenie nemá vákuové čerpadlo. To sa len historicky používalo na zníženie absorpcie pozadia. Neskôr sa však zistilo, že v tomto rozsahu vlnov-

vých dĺžok ho spoľahlivo nahradí aj pomocný („make-up“) plyn s nízkou absorptivitou (dusík alebo argón)⁶.

Eluenty z GC kolóny sa do VUV detektora dostávajú prostredníctvom kremennej kapiláry, ktorá je väčšinou vyhriata na 300 °C (VGA-100)⁵ alebo u najnovšieho (VGA-101) do 450 °C (kompatibilný s vysokoteplotnými GC aplikáciami)⁷, čím sa zabráni kondenzácii. Tesne pred vstupom do analytickej prietokovej cely (vyhriata až do 320 °C) o dĺžke 10 cm a vnútornom objeme cca. 80 μl (VGA-100) alebo 40 μl (VGA-101) sa eluenty miešajú s pomocným plynom. Keďže tlak tohto plynu (bežne okolo 0,15 psi pri N₂) ovplyvňuje prietok cez detekčnú celu, a teda aj dobu zotrvania analytov vo vzorkovej zóne, má zásadný vplyv na rozlišovaciu schopnosť detektora. Dlhšie zotrvanie sice znižuje šum v dôsledku akumulácie dát (opakované merania), ale taktiež vedie aj k rozšíreniu píku analytov. Významnú úlohu však hrá aj špeciálna reflexná optika, ktorá dokáže fokusovať svetlo do prietokovej cely cez okienka fluoridu horečnatého. Prepustené fotóny z nízkočreknovej ultrafialovej oblasti elektromagnetického spektra sú následne nasmerované prostredníctvom holografickej mriežky do CCD senzora (charged coupled device – zariadenie s viazanými nábojmi), ktoré dokáže zaznamenať širokopásmové spektrá eluentov v rozsahu 120–240 nm (VGA-100) alebo 120–430 nm (VGA-101). Keďže tieto štruktúrne bohaté UV spektrá sú zosnímané v plynnnej fáze, znižuje sa tým výrazne vplyv rozpúšťadla a obmedzia medzimolekulové interakcie. Napriek tomu je potrebné z nich ešte odčítať signál pozadia, ktorý sa zaznamená pred každým experimentom. Rýchlosť zberu dát je obvykle nastavená na 100 Hz, aby meranie bolo kompatibilné s kapilárnou GC analýzou.

Obr. 1 zobrazuje VUV spektrá vybraných referenčných psychoaktívnych látok so sumárnym vzorcom C₁₂H₁₇NO a monoizotopickou hmotnosťou 191,1310 g mol⁻¹. Hoci ide o izoméry, je zjavné, že všetky poskytujú

jedinečné VUV spektrá. Práve na ich základe je založená následná identifikácia. Tá zvyčajne spočíva v porovnaní nameraných dát s knižnicou referenčných spektier⁶. Hoci knižnica VUV spektier sa rýchlo rozrastá a v súčasnosti už obsahuje viac ako 2000 spektier látok, zatiaľ však ani zďaleka nie je tak rozsiahla ako knižnica hmotnostných spektier pre ionizáciu nárazom elektrónu. Alternatívnou možnosťou je preto výpočet teoretických VUV/UV spektier jednotlivých kandidátnych štruktúr rôznymi metódami od semiempirických prístupov až po sofistikované kvantovo-mechanické výpočty, ktoré dokážu predpovedať elektronické excitáčnne energie (zodpovedajú vlnovej dĺžke absorpcie) a silu oscilátora (zodpovedá intenzite absorpcie)⁸. Náročnosť a presnosť výpočtu spektier však úzko súvisí s veľkosťou ako aj komplexnosťou molekuly. Preto teoretické VUV spektrá nie vždy plne zodpovedajú tým, ktoré sú získané experimentálne.

3. Kvantitatívna analýza analytov pomocou VUV detekcie

Kvantitatívnu analýzu riadi Lambertov-Beerov zákon:

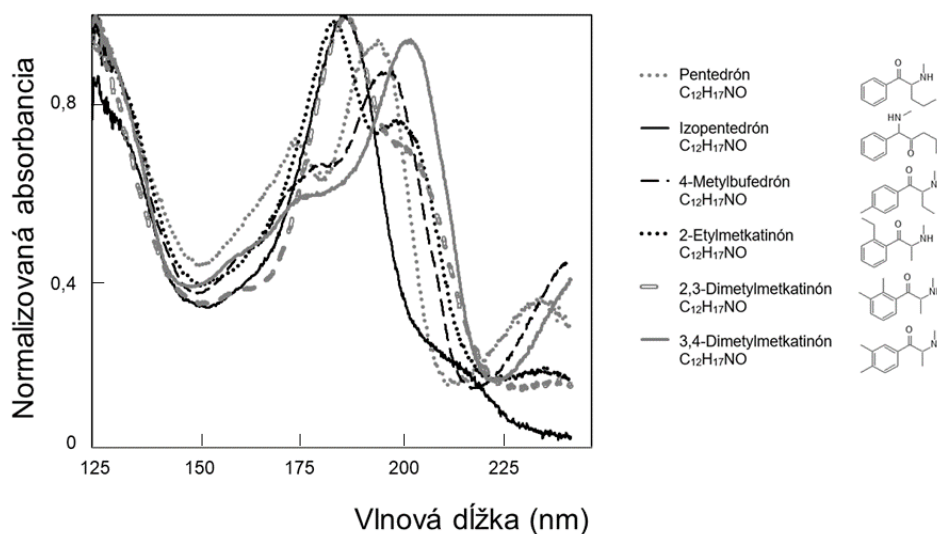
$$A = \epsilon lc \quad (1)$$

kde A je absorbancia, ϵ je mólový absorpčný koeficient (l mol⁻¹ cm⁻¹), l je dĺžka absorpčného prostredia (cm) a c je koncentrácia absorbujúcej látky (mol l⁻¹).

$$A = \sigma n \quad (2)$$

kde σ účinný prierez absorpcie (cm²/molekula) a n objemová hustota (hmotnosť) častíc v absorpčnom prostredí (molekula/cm³).

Pokiaľ teda nedochádza k interferenciám zložiek vo vzorke, VUV absorpcie sú aditívne. Ich intenzita je, podobne ako pri konvenčnej UV v kvapalnej fáze, závislá od množstva analytov prítomných v prietokovej cele za jed-



Obr. 1. VUV spektrá izomérov vybraných psychoaktívnych látok; (prepracované podľa cit.¹⁰)

notku času. Na základe nameraného absorpčného signálu je preto možné vypočítať presný počet molekúl v detektore za predpokladu, že sú známe účinné prierezy absorpcie všetkých chemických zlúčenín vo vzorke. Podľa terminológie definovanej Hulanickým⁹, GC-VUV možno dokonca považovať za techniku, ktorá umožňuje stanoviť „pseudo-absolútne“ množstvá analytov vo vzorke, a to bez potreby kalibrácie¹⁰. Predtým je však potrebné pomocou štandardov stanoviť tzv. prístrojovú konštantu (t.j. stupeň straty vzorky napr. pri splitovom nástreku) a z rozsahu nameraných absorpcií vypočítať množstvá jednotlivých analytov v prietokovej cele.

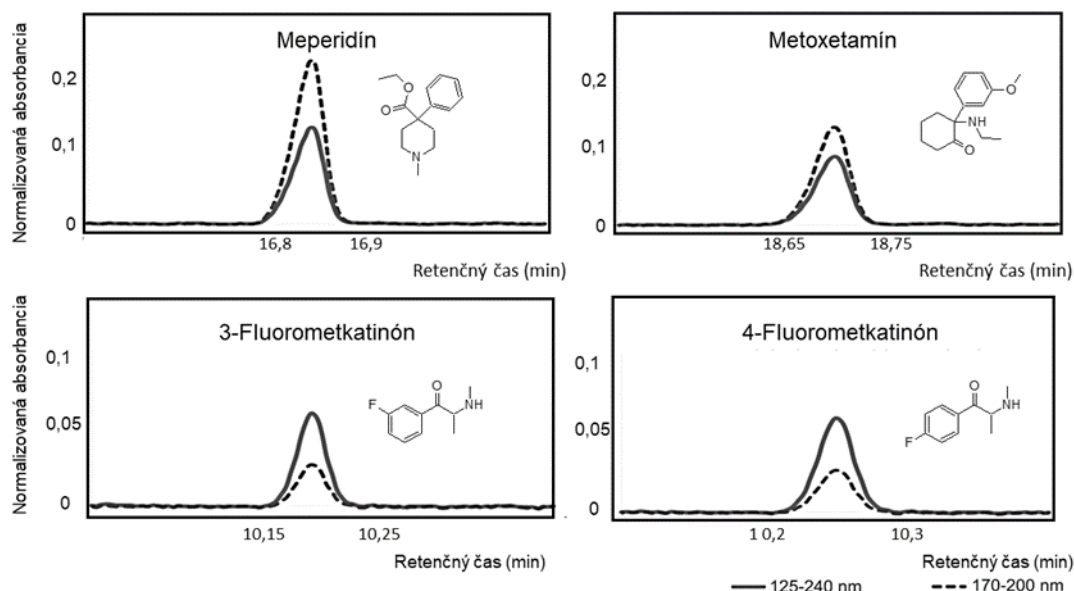
VUV detektor vykazuje najvyššiu odozvu (dosiahnutie najnižších medzi detekcie) pri aromatických a heteroatóm-obsahujúcich organických analytoch. Funkčné domény týchto látok totiž obsahujú vhodné chromofóry pre absorpciu fotónov. Odozva detektora pri alkánoch je síce trochu nižšia, ale pri nízkych vlnových dĺžkach počet uhlíkov úzko koreluje s účinným prierezom absorpcie. Spektrá alkánov sú však menej bohaté, a preto k správnej identifikácii sa odporúča sledovať aj retenčné indexy v GC. Najslabšiu odozvu vykazuje voda a metanol, ktoré majú najmenej intenzívne účinné prierezy absorpcie. Kvantifikáciu však ovplyvňuje aj správny výber rozsahu vlnových dĺžok. VUV detektor však väčšinou zosníma absorpčné spektrá v plnom svojom rozsahu (125–240 nm), a preto je možné chromatogramy dodatočne reprocessovať prostredníctvom digitálnych spektrálnych filtrov, čím sa zvýši selektivita ako aj množstvo kvantifikovaných analytov v závislosti od ich absorpčných vlastností. Obr. 2 zobrazuje normalizovanú absorbciu vybraných psychoaktívnych látok pri plnom rozsahu vlnových dĺžok VUV detektora (125–240 nm), ako aj za použitia spektrálneho filtra

(170–200 nm – pre aromatické látky), ktorá je vynesena voči retenčnému času. Hoci každá z týchto látok má jeden benzenový kruh, t.j. štruktúrny rys zvyšujúci absorpciu v rozsahu 170–200 nm, zvýšenie bolo pozorované iba u tých, ktoré neobsahovali halový prvok. Absorpcia 3-fluorometkatinónu a 4-fluorometkatinónu sa znížila, pravdepodobne v dôsledku indukčného účinku atómu fluóru¹¹.

Ako z horeuvedeného priamo vyplýva, absorpcia analytov vo VUV závisí od ich štruktúry. Medza detekcie pre modelový analyt benzén dosiahla pri tejto detekcii hodnotu 15 pg (pri pomere signál-šum, S/N=3)⁵. Podobné hodnoty niekoľkých pikogramov analytu na kolóne boli namerané aj prostredníctvom plameňovo-ionizačného detektora (flame ionization detector, FID), či MS. Tepelne vodivostný detektor (thermal conductivity detector, TCD), či detektor elektrónového záchytu (electron capture detector, ECD) takéto malé množstvá analytu nedokázali zachytiť. Linearita (pre benzén) pri VUV detekcii bola stanovená v rozsahu 3 až 4 rádov v závislosti od použitého spektrálneho filtra (rozsahu vlnovej dĺžky) a medza stanovenia na 62,2 pg pri S/N = 12. Pokiaľ ide o stabilitu, detektor počas 1 hodinovej analýzy za štandardných podmienok vykázal posun len o $\pm 1,25 \cdot 10^{-5}$ Abs min⁻¹ (cit.⁵).

4. Dekonvolúcia koelujúcich analytov v plynovej chromatografii

Jedna z najpozoruhodnejších funkcií VUV softvéru je schopnosť dekonvolúcie spektrier, t.j. spektrálneho rozlíšenia signálov prekrývajúcich sa analytov. Ako je zjavné z predchádzajúcej časti, aj pri viacložkovej analýze sa na

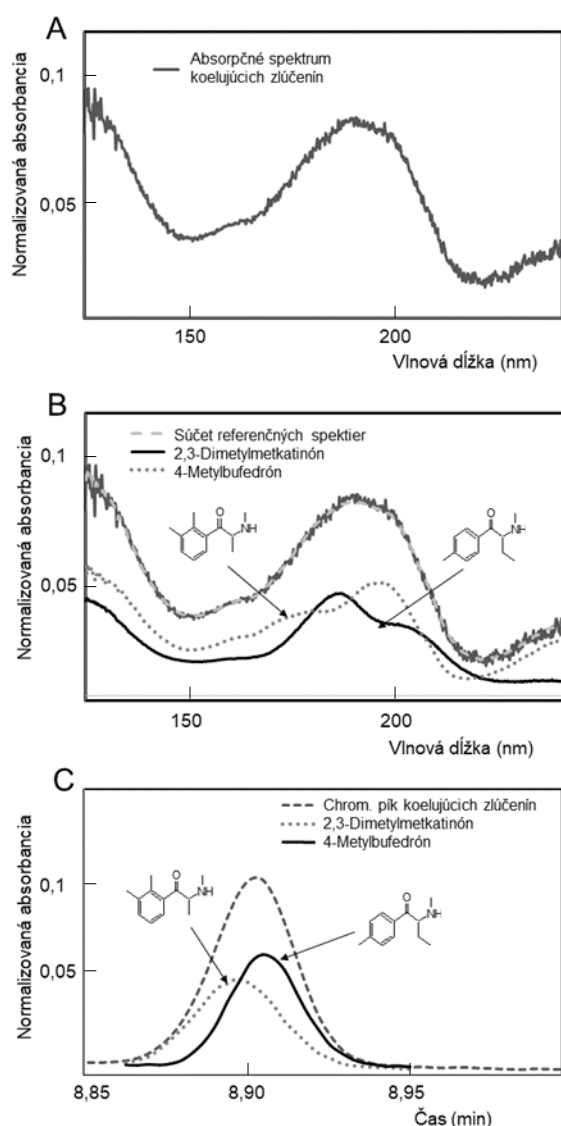


Obr. 2. Normalizovaná absorbcia vybraných psychoaktívnych látok pri plnom rozsahu vlnových dĺžok VUV detektora (125 až 240 nm) a s použitím spektrálneho filtra (170–200 nm – pre aromatické látky) vynesená voči retenčnému času; (prepracované podľa cit.¹¹)

každú zlúčeninu v zmesi samostatne uplatňuje Lambertov-Beerov zákon (jeho aditívny charakter)¹². Celková namieraná absorbanca je teda súčtom absorbancií jednotlivých zložiek a priamo súvisí s účinným prierezom absorpcie cez Avogadrovú konštantu. Obr. 3 ilustruje priebeh dekonvolúcie. Z chromatografických pikov sa najskôr extrahujú absorpčné spektrá a tie sa následne preložia lineárnou kombináciou referenčných spektier potenciálnych koelujúcich látok za použitia lineárnej regresie. Výsledkom je určenie najpravdepodobnejších „neznámych“ zlúčenín a ich príspevku do koelučného signálu. Najnovšou modifi-

káciou tejto schopnosti je dekonvolúcia v časovom intervale (time interval deconvolution, TID)¹³. Tento prístup je založený na odhade lineárnej kombinácie spektier látok v určitom časovom intervale, v ktorom tieto zlúčeniny koelujú. K tomu je ale potrebné poznať aj retenčné indexy v GC a faktory relatívnej odozvy, ktoré boli nedávno priradené do knižníc VUV spektier referenčných látok.

Či je však dekonvolúcia vôbec možná, to závisí najmä od stupňa spektrálnej odlišnosti prekrývajúcich sa analytov. Ak dva analyty majú dostatočne odlišné absorpčné spektrá, potom sa dajú spoľahlivo rozlíšiť v širokom rozsahu relatívnych množstiev. Čím sú si ale tieto analyty spektrálne podobnejšie, tým je obťažnejšie ich rozlíšiť. Je preto takmer nemožné uskutočniť dekonvolúciu prekrývajúcich sa signálov analytov, ak ich absorpčné spektrá sú si podobné. V prípade, keď jedna z nich sa nachádza v zmesi vo veľmi malom množstve, je to ešte zjavnejšie. Schopnosť spektrálneho rozlíšenia sa totiž výrazne znižuje s klesajúcim množstvom látok v zmesi, najmä keď sa koncentrácia minoritnej zložky približí k medzi detekcie. Tá môže byť dokonca výrazne vyššia v dôsledku spoločnej elúcie. Schopnosť dekonvolúcie je ale aj napriek týmto úskaliám obrovskou výhodou VUV detektora. V porovnaní s inými GC detektormi totiž umožňuje rozlíšiť aj koelujúce látky v zmesi bez potreby ďalšej chromatografickej separácie za použitia špeciálnych kolón, či optimalizácie chromatografickej metódy. Potrebná je len knižnica čistých referenčných spektier prekrývajúcich sa analytov.



Obr. 3. Priebeh dekonvolúcie koelujúcich signálov. A – Absorpčné spektrum koelujúcich zlúčenín, B – Proces dekonvolúcie – preloženie kombinácie referenčných spektier koelujúcich látok za použitia lineárnej regresie, C – Koelujúce signály najpravdepodobnejších „neznámych“ kandidátnych zlúčenín a ich príspevku v chromatografickom piku. (prepracované podľa cit.¹¹)

5. Aplikácie možnosti GC-VUV

VUV detektor je z hľadiska účinnosti porovnateľný s inými typmi GC detektorov. V mnohých prípadoch ich dokonca prevyšuje. Napríklad prítomnosť vody nie je ani len možné detegovať pomocou FID a aj prostredníctvom MS len veľmi zriedkavo⁵. Podobne aj *N*-trihalometyltiofungicid kaptán je kvôli extrémnej labilite veľmi náročné identifikovať a odlišiť od podobných zlúčenín ako napríklad folpet⁵. VUV detektor sa teda skôr javí ako komplementárny a univerzálny nástroj na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu širokej škály analytov^{6,14}.

Hoci táto detekčná technika má aj svoje nedostatky, medzi ktoré patrí jemne znížená detekčná schopnosť, či selektivita pri homológoch v porovnaní s MS, dôraz v tejto podkapitole budeme klásť na pridanú hodnotu VUV detekcie. Viac ako tretinu doterajších aplikácií VUV detektora tvoria analýzy ropných produktov. Nasledujú analýzy potravín a potravinových aróm. Významný podiel ale tvoria aj forenzné analýzy, analýzy životného prostredia a aplikácie v oblasti výskumu živej prírody.

5.1. Analýzy ropných látok

Potenciál tejto detekčnej techniky pri charakterizácii ropných látok predstavil Schug a spol. vo svojej práci z roku 2014 (cit.⁵). Následná analýza stálych plynov¹⁵ preukázala, že aj malé molekuly, či lineárne alebo rozvetvené C1–C5 uhľovodíky, voda, kyslík, dusík, metán a pod.

vykazujú špecifické spektrálne črty pri VUV detekcii. Krátko na to Worton a spol.¹⁶ analyzovali uhl'ovodíky prítomné v rope. Autori zistili, že VUV v porovnaní s MS minimalizuje tvorbu fragmentov molekulárnych iónov, čím uľahčuje charakterizáciu uhl'ovodíkov. V analyzovaných vzorkách dominovali lineárne alkány ($8 \pm 1 \%$), rozvetvené alkány ($11 \pm 2 \%$) a cykloalkány ($37 \pm 12 \%$) s jedným alebo dvoma kruhmi a jedným alebo viacerými alkylovými bočnými reťazcami ($27 \pm 9 \%$). Nowak a spol.¹⁷ následne uskutočnili analýzu ropy v zásobníkoch a sledovali zmeny spôsobené mikrobiálnym spoločenstvom. Pomocou GC-VUV-TOFMS (GC-VUV spojený s MS analyzátorom času letu) a FT-ICR MS (iónová cyklotrónová rezonančná hmotnostná spektrometria s Fourierovou transformáciou) analyz určili degradačné vzorce a potvrdili, že opracovanie ropy dusičnanmi a chloristanom významne znížilo produkciu sulfidov.

Mao a spol. charakterizovali pomocou VUV detekcie zmes parafínov, izoparafínov, olefínov, nafténov a aromatických uhl'ovodíkov v palivách (PIONA)¹⁸. Táto práca viedla k návrhu štandardnej metódy rýchleho stanovenia uhl'ovodíkov D8071 ASTM (cit.¹³), ktorá sa už úspešne používa pri analýzach benzínových palív. Autori následne detailne analyzovali alkány a porovnali získané experimentálne výsledky s teoretickými kvantovo-mechanickými výpočtami¹⁹. Z ich práce je zjavné, že prvá silná excitácia alkánov nie je vždy spôsobená HOMO-LUMO prechodom. Dunkle a spol.²⁰ zároveň porovnali PIONA analýzu uskutočnenú s GC-VUV s výsledkami DHA (detailná uhl'ovodíková analýza) a GC×GC-FID analýzami. Autori poukázali na dobrú zhodu a opakovateľnosť týchto metód. GC-VUV však v tomto porovnaní dopadla lepšie, keďže dosiahla kratší čas analýzy a vyšší počet správnych identifikácií.

Rozlíšenie uhl'ovodíkov v dieselových palivách a ľahkých olejoch predstavil Weber a spol.²¹. Na separáciu mono-, di- a polyaromatických zložiek použili stacionárne fázy s vysoko polárnymi iónovými kvapalinami. Vzápätí Schenk a spol.²² uskutočnili analýzu dimetylnaftalénov vo vzorkách leteckých a dieselových palív. Tieto izomérové látky bolo takmer nemožné analyzovať prostredníctvom MS, a to najmä z dôvodov častej koelúcie a podobnosti hmotnostných spektier. Navyše tieto látky majú aj podobnú polaritu a bod varu. Autori však dokázali, že VUV detektor za vhodných injekčných podmienok a za použitia TID tieto prekrývajúce sa analyty rozlíši bez väčších problémov.

Bai a spol.²³ sa venovali analýze zvetraných dieselových palív prostredníctvom GC-VUV, GC-FID a GC×GC-MS. Autori zistili, že GC-FID síce postačuje na definovanie charakteristických markerov, avšak kvôli koelúcii nedokáže rozlíšiť analyty v tak komplexnej zmesi. Naproti tomu GC-VUV bez problémov rozpoznala charakteristické látky, klasifikovala ich do tried, a prostredníctvom týchto markerov určila vek palív. Zhodnotenie výsledkov viedlo k záveru, že počas zvetrávania dochádza k znižovaniu množstva ľahkých uhl'ovodíkov. Liu a spol.²⁴ následne vyvinuli metódu na rýchle rozlíšenie ľahkých uhl'ovodíkov. Prostredníctvom krátkej monolitckej kremičitej kapilárnej kolóny, priamo spojenej s VUV detekciou, sa im

podarilo chromatograficky rozdeliť zmes metánu, etánu, oxidu uhoľnatého a oxidu uhličitého za 15 s.

5.2. Potraviny a potravinárske arómy

GC-VUV našla uplatnenie aj pri analýze potravín a aromatických zlúčenín. Bola napríklad použitá na stanovenie celkovej hladiny aromatických uhl'ovodíkov v purifikovaných minerálnych olejoch, ktoré sa používajú v potravinárskom, či vo farmaceutickom priemysle alebo pri výrobe kozmetických prípravkov⁷. Autori vyvinuli rýchlu metódu na stanovenie týchto látok bez potreby separácie, ktorej výsledky boli porovnateľné s doteraz používanými metódami založenými na FID detekcii. VUV bola testovaná aj pri analýzach metylesterov mastných kyselín (fatty acid methyl esters, FAME)²⁵. Autori najskôr pomocou stacionárnej fázy s iónovými kvapalinami zlepšili separáciu polohových izomérov, či stereoizomérov mastných kyselín, ako aj metyl- a etylesterov omega-3 a omega-6 mastných kyselín s dlhými reťazcami a zároveň využili funkcionálnosť VUV detektora, ktorý zabezpečil ďalšiu separačnú rozmer. Fan a spol.²⁶ zároveň zosnívali VUV spektrá ďalších nasýtených, mononenasýtených a polynenasýtených FAME a zistili, že nenasýtené FAME vykazujú výrazne odlišné absorpčné profily oproti nasýteným. Autori preukázali, že VUV dokáže rozlíšiť aj *cis* a *trans* izoméry. VUV detekcia bola zároveň použitá aj pri analýze fotoiniciátorov v baleniach potravín²⁷. Autori zistili, že detektor dokáže hravo rozlíšiť aj izomérmé štruktúry, ako sú metylbenzofenóny, ktoré nie sú detekovateľné pomocou MS.

VUV našla uplatnenie aj pri stanovení terpénov^{28,29} v príchutiach a arómach. Získané spektrá vykazovali charakteristické črty, ktoré umožnili ich jednoduchú diferenciaciu. Autori zároveň preukázali veľmi sľubné medzi stanovenia tejto detekčnej techniky. Santos a spol.³⁰ popri tom analyzovali vanilkové extrakty. Zistili, že všetky vzorky obsahovali vanilín, avšak etylvanilín a piperonal obsahovali len umelo vyrobené extrakty. Výhody spojenia VUV a MS boli testované aj pri analýze štruktúrne podobných prchavých organických zlúčenín (volatile organic compounds, VOC) vo vzorkách parfumov a éterických olejov^{31,32}. Autori preukázali, že multidoménové vyhľadávanie v knižniciach VUV a MS umožňuje zlepšiť presnosť a spoľahlivosť identifikácie.

5.3. Analýza látok prítomných v živých systémoch

GC×GC-VUV bola tiež použitá na analýzu VOC v dychu ľudí³³. Vzorky boli získané mikroextrakčným postupom. Autori nielen rozpoznali sledované látky, ale dosiahli aj veľmi sľubné detekčné limity, ktoré sa pohybovali v nanogramových množstvách. Santos a spol.³⁴ pre zmenu použili GC-VUV na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie mastných kyselín v krvnej plazme. Autori zistili, že nástrek veľkého objemu zlepšuje detekčné limity metódy. Na rozpoznanie polohových izomérov (C16: 1 [n-7 a n-9] a C18: 1 [n-7 a n-9]), pri ktorých VUV vykazoval vysokú podobnosť, použili kolónu Fawemax (Restek). VUV bola zároveň použitá aj na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie mono-, di- a trisacharidov³⁵. Identifikácia týchto zlúčenín prostredníctvom GC-MS je limitovaná

v dôsledku vysokej štruktúrnej podobnosti a častej chromatografickej koelúcie. Autori preukázali, že VUV detektor umožňuje účinnú diferenciáciu izomérnych druhov sacharidov, ako sú ketopentózy, či redukujúce *versus* neredukujúce cukry.

VUV detekcia spojená s GC bola tiež použitá aj na analýzu liečiv. Zheng a spol.³⁶ ju použili na skrining organických rozpúšťadiel na prítomnosť stopového množstva vody. Autori v tejto štúdií identifikovali *n*-hexán ako vhodné rozpúšťadlo pre 4-etoxy-1,1,1-trifluór-3-butén-2-ón (ETFBO), ktorý sa javí ako kľúčová látka vo vývoji lieku voči vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV). Muthal³⁷ síce tiež sledoval množstvo zvyškovej vody v zmesi rozpúšťadiel po extrakcii, ale hlavným zameraním jeho práce bola detekcia steroidných hormónov – glukokortikoidov, ktoré sa bežne nachádzajú ako cudzorodé látky v rastlinných medicínskych produktoch. Autor úspešne detegoval skúmané látky a preukázal veľmi dobré detekčné limity predstavené metódy.

5.4. Forenzné analýzy

Roberson a Goodpaster³⁸ použili GC-VUV na analýzu fenetylaminov. Na základe analýzy hlavných komponentov (PCA – Principal component analysis) a diskriminačnej analýzy jasne rozpoznali skúmané analyty, a to aj napriek podobným spektrálnym vlastnostiam. Autori ďalej preukázali, že diferenciácia stereoizomérov efedrínu a pseudoefedrínu je uskutočniteľná. Podobne Škultéty a spol.¹¹ na základe charakteristických VUV spektier rozpoznali 43 nových dizajnerských psychoaktívnych látok. Autori preukázali, že VUV spektrá sú veľmi dobre reprodukovateľné a charakteristické, a preto umožňujú aj spoľahlivé rozlíšenie izomérov. Dizajnerským drogám sa venovali aj Kranenburg a spol.³⁹, ktorí tiež demonštrovali, že GC-VUV je vhodná technika na diferenciáciu izomérov psychoaktívnych látok vo forenzných laboratóriách. Navyše schopnosť dekonvolúcie prostredníctvom TID znižuje požiadavky na chromatografické rozlíšenie. K týmto záverom dospeli aj Leghissa a spol.^{40,41} pri detekcii kanabinoïdov a ich metabolitov. Možnosť rozlíšenia izomérnych druhov vo VUV ocenili aj Buchalter a spol.⁴², ktorí uskutočnili kvalitatívnu ako aj kvantitatívnu analýzu analógov syntetických opioidov fentanylu pomocou GC-MS so studenou elektronickou ionizáciou, paralelne spojenou s VUV detekciou. Autori použitím spektrálneho filtra 175 až 205 nm, v ktorom aromatické funkčné skupiny vykazujú preferenčnú absorpciu, navyše preukázateľne znížili medze detekcie metódy.

GC-VUV bola nedávno použitá na analýzu výbušnín obsahujúcich estery dusičnanov⁴³. Autori skúmali tepelnú degradáciu týchto látok v prietokovej cele detektora a testovali reálne vzorky intaktných a spálených výbušnín. Prekursorom výbušnín sa venovali aj Reiss a spol.⁴⁴, ktorí sledovali aj simulanty chemických bojových látok. Autori preukázali najmä dobrú diferenciáciu nitroaromatických izomérov.

5.5. Životné prostredie

Fan a spol.¹¹ analyzovali pesticídy. Autori zistili, že určité skupiny látok vykazujú podobné absorpčné spektrá, ktoré sú však výrazne odlišné od iných skupín. Použitím

spektrálnych filtrov tak jednoznačne odlišili aromatické od alifatických pesticídov, ako aj identifikovali izoméry. Qiu a spol.⁴⁵ prostredníctvom TID rozlíšili koelujúce látky a identifikovali 209 polychlórovaných bifenyllov (PCB). Zároveň sa im podarilo klasifikovať komerčné zmesi PCB podľa stupňa chlorácie. Drozd a spol.^{46,47} sa venovali analýze uhl'ovodíkov uvoľnených do ovzdušia. Prvá ich práca bola založená na odparení minerálneho oleja a analýze prchavých a poloprchavých zložiek prostredníctvom unikátnej kombinácie GC-VUV-TOFMS. Autorom sa podarilo identifikovať uhl'ovodíky s 10–30 atómami uhlíka a klasifikovať ich podľa stupňa vetvenia, počtu cyklických kruhov a molekulovej hmotnosti. Druhá práca sa venovala analýze sekundárneho organického aerosolu z výfukových plynov benzínových automobilov. Prostredníctvom GC×GC-VUV-MS s termálnou desorpciou zistili, že v aerosoli dominujú uhl'ovodíky z motorového oleja. GC-VUV bola taktiež použitá na analýzu formaldehydových výluhov z propantov (bridlicový plyn)⁴⁸. Autori skúmali výhody a nevýhody rôznych analytických techník, ako napríklad „headspace“ (HS, zariadenie s uzavretým priestorom nad látkou)-GC-MS, LC-UV, či HS-GC-VUV a zistili, že HS-GC-VUV síce umožňuje detekciu formaldehydu v jeho natívnej forme (bez derivatizácie), ale jeho koelúcia s vodou, ktorá je prítomná vo veľkom množstve, detekciu komplikuje. Preto označili techniku HS-GC-MS za vhodnejšiu pri tejto aplikácii.

GC-VUV bola tiež použitá na identifikáciu environmentálnych baktérií³⁴ a charakterizáciu zmien v prítomnosti rôznych kontaminantov⁴⁹. Autori na základe špecifických profilov metylesterov mastných kyselín najskôr úspešne rozpoznali 15 druhov baktérií, patriacich k 12 rodom a následne sledovali zmeny v profiloch mastných kyselín, ako aj proteínov v prítomnosti rôznych kontaminantov, charakteristických pre procesy spracovania ropy a plynu, ako sú napríklad vysoké hladiny solí, benzénu alebo alkoholov. Sanácii environmentálnych záťaží sa venovali aj Ponduru a spol.⁵⁰. Prostredníctvom GC-VUV mapovali oxidáciu polycyklických aromatických uhl'ovodíkov. Zistili, že pomocou komplexu s meďou sa antracén konvertuje na 9,10-antrachinón, naftalén na 1,4-naftochinón a pyrén na 4,5-, 1,6- alebo 1,8-pyrénchinón.

5.6. Iné aplikácie VUV detekcie

Skúmali sa aj ďalšie aplikácie. Napríklad Weston a spol.⁵¹ použili VUV na charakterizáciu izotopológov. Stabilné izotopovo značené vnútorné štandardy sa bežne používajú v analytickej chémii pri stopových analýzach alebo kvantifikácii, keďže majú rovnaké fyzikálno-chemické vlastnosti ako skúmané analyty, ale ich signál je ľahko rozlíšiteľný na základe molekulovej hmotnosti. Autori na sérii benzénových izotopológov síce pozorovali len veľmi malé rozdiely v absorpčných spektrách, ale následne sa ukázalo, že zvyšujúcim sa stupňom deuterácie sa zvyšuje aj spektrálny rozdiel medzi značenými a neznačenými analytmi. Shear-Laude⁵² pre zmenu použila VUV ako možnú alternatívu k široko používanej titracii podľa Karla Fischera na kvantifikáciu vody. Opakované merania obsahu zvyškovej vody v organických rozpúšťadlách preukázali dobrú presnosť a nízku medzu detekcie pri lineárnom dynamickom rozsahu 10 až 10 000 ppm.

Širšie akceptovanie VUV v rutinej analýze je ale brzdené nedostatkom štandardizovaných metód, ako aj vyššími nákladmi, v porovnaní s FID alebo MS detekciou s kvadrupólovým analyzátorom. Očakáva sa však, že postupným rozširovaním knižnice referenčných VUV spektier sa zvýši aj využitie tejto komplementárnej detekčnej techniky. Vývoj hybridných detekčných techník, v ktorých VUV je paralelne alebo sériovo spojený s inou detekčnou technikou, najmä s MS, sa tiež ukazuje ako správny a rýchlo rozvíjajúci sa trend. Takéto spojenia totiž môžu viesť k unikátnym výhodám (napríklad detekcia/identifikácia širokého spektra analytov v komplexných zmesiach), ktoré nemožno dosiahnuť aplikáciou jednotlivých detektorov samostatne. K plnému využitiu potenciálu VUV prispievajú aj pokročilejšie metódy separácie použitím špeciálnych kolón alebo separácie vo viacerých rozmeroch. Za zmienku isto stoja aj teoretické výpočty VUV absorpčných spektier, ktoré môžu napomôcť pri identifikácii neznámych zlúčenín, alebo v prípadoch, ak je veľmi problematické získať referenčné látky.

6. Záver

VUV detektor bezpochyby patrí k jedným z najvýznamnejších a najvšestrannejších GC detektorom. Poskytuje kvalitatívne a kvantitatívne informácie o analytoch, pričom v niektorých ohľadoch prekonáva aj limity najčastejšie používaného GC detektora – hmotnostnej spektrometrie, ako napríklad rozlíšenie izomérnych alebo koelujúcich zlúčenín, alebo detekcie labilných, či veľmi malých (s nízkou molekulovou hmotnosťou) molekúl. Viaceré publikácie spomenuté v tejto prehľadnej práci preukázali, že VUV detektor na základe jedinečných absorpčných spektier naozaj dokáže detegovať malé alebo labilné zlúčeniny a rozlíšiť izoméne, či koelujúce látky. Preto si táto spektroskopická detekčná technika tak rýchlo našla uplatnenie v rôznych oblastiach výskumu. VUV detektor sa však javí aj ako pozoruhodné zariadenie z hľadiska kvantifikácie analytov. Pri istých aromatických látkach hravo dosiahol detekčné limity iba niekoľkých pikogramov. Je teda približne rovnako citlivý ako kvadrupólový analyzátor MS prevádzkovaný v skenovacím režime. Z týchto dôvodov VUV spektroskopie nie je iba konkurenčnou technikou k MS a FID detektorom, ale je aj vysoko komplementárna.

Túto svoju vlastnosť potvrdila aj v aplikáciách, kde bola paralelne alebo sériovo spojená s iným GC detektorom (väčšinou MS), čo poskytlo duálne kvalitatívne ako aj kvantitatívne informácie. Samozrejme, možné sú však aj spojenia s GC×GC, čím tejto separačnej technike dodá ďalší rozmer, ktorý napomôže najmä pri analýzach vysoko komplexných zmesí s veľkým obsahom izomérnych látok.

Táto detekčná technika nedávno prekvapila aj ďalšou zaujímavou schopnosťou, a to pseudo-absolútnou kvantifikáciou a dekonvolúciou v časovom intervale, ktoré umožňujú kvantitatívne rozlíšiť v podstate všetky zložky vo vzorke, a to aj v prípade koelúcie. Tým sa nielen výrazne znižujú nároky na chromatografickú separáciu, ale aj analýzu dát pri zložitých zmesiach. To je možné využiť najmä pri aplikáciách s veľmi rýchlou GC, kde je možný kompromis v prospech skrátenia analýzy. Pseudo-absolútna

kvantifikácia navyše umožňuje kvantifikáciu analytov aj bez potreby kalibrácie. Ide teda o veľmi zaujímavý prístup, ktorý je však ešte potrebné lepšie preskúmať. V prvom rade sa musí preukázať ich účinnosť v ďalších reálnych aplikáciách. Musí sa však preukázateľne zhodnotiť aj presnosť nameraných dát v porovnaní s tradičnými metódami. Napriek tomu veríme, že táto platforma v budúcnosti ešte prinesie ďalšie nové vylepšenia, ktorými preukáže svoju výnimočnosť, a tým sa ešte viac odliší od iných GC detektorov.

Práca bola podporená Ministerstvom školstva, mládeže a telovýchovy Českej republiky (LO1509).

Zoznam skratiek

CCD	zariadenie s viazanými nábojmi, charged coupled device
DHA	detaillná uhl'ovodíková analýza, detailed hydrocarbon analysis
ECD	detektor elektrónového záchytu, electron capture detector
FAME	methyl ester masné kyseliny, fatty acid methyl ester
FT-ICR	iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou, Fourier transform ion cyclotron resonance
FID	plameňovo-ionizačný detektor, flame ionization detector
FUVD	detektor s vlnovou dĺžkou v ďalekej ultrafialovej oblasti, far UV detector
PCB	polychlóvaný bifenyľ, polychlorinated biphenyl
PID	fotoionizačný detektor, photoionization detector
TCD	tepelne vodivostný detektor, thermal conductivity detector
TID	dekonvolúcia v časovom intervale, time interval deconvolution
TOF	analyzátor doby letu, time-of-flight
VUV	vákuum-ultrafialový, vacuum ultra violet
VOC	prchavé organické zlúčeniny, volatile organic compound

LITERATÚRA

- Middleditch B. S., Sung N. J., Zlatkis A., Settembre G. T.: *Chromatographia* 23, 273 (1987).
- Driscoll J. N., Duffy M., Pappas S.: *J. Chromatogr. A* 441, 63 (1988).
- Lagesson V., Lagesson-Andrasko L., Andrasko J., Baco, F.: *J. Chromatogr. A* 867, 187 (2000).
- Hatzinikolaou D. G., Lagesson V., Stavridou A. J., Pouli A. E., Lagesson-Andrasko L., Stravrides J. C.: *Anal. Chem.* 78, 4509 (2006).
- Schug, K. A., Sawicki I., Carlton Jr., D. D., Fan H., McNair H. M., Nimmo J. P., Kroll P., Smuts J., Walsh P., Harrison D.: *Anal. Chem.* 86, 8329 (2014).

6. Santos I. C., Schug, K. A.: *J. Sep. Sci.* **40**, 138 (2017).
7. García-Cicourel A. R., Janssen H. G.: *J. Chromatogr. A* **1590**, 113 (2019).
8. Giuliani A., Motte-Tollet F.: *J. Chem. Phys.* **110**, 10307(1999).
9. Hulanicki A.: *Pure Appl. Chem.* **67**, 1905 (1995).
10. Bai L., Smuts J., Walsh P., Qiu C., McNair H. M., Schug K. A.: *Anal. Chim. Acta* **953**, 10 (2017).
11. Skultety L. a 12 spoluautorov: *Anal. Chim. Acta* **971**, 55 (2017).
12. Fan H., Smuts J., Walsh P., Harrison D., Schug, K. A.: *J. Chromatogr. A* **1389**, 120 (2015).
13. Walsh P., Garbalena M., Schug, K. A.: *Anal. Chem.* **88**, 11130 (2016).
14. Lelevic A., Souchon V., Moreaud M., Lorentz C., Geantet C.: *J. Sep. Sci.* **43**, 150 (2020).
15. Bai L., Smuts J., Walsh P., Fan H., Hildebrand Z., Wong D., Wetz D., Schug K. A.: *J. Chromatogr. A* **1388**, 244 (2015).
16. Worton D. R., Zhang H., Isaacman-VanWertz G., Chan A. W., Wilson K. R., Goldstein A. H.: *Environ. Sci. Technol.* **49**, 13130 (2015).
17. Nowak J. A., Shrestha P.M., Weber R. J., McKenna A. M., Chen H., Coates J. D., Goldstein A.H.: *Environ. Sci. Technol.* **52**, 1290 (2018).
18. Mao J. X., Walsh P., Kroll P., Schug K. A.: *Appl. Spectrosc.* **74**, 72 (2019).
19. Mao J. X., Kroll P., Schug, K. A.: *Struct. Chem.* **30**, 2217 (2019).
20. Dunkle M. N., Pijcke P., Winniford B., Bellos G.: *J. Chromatogr. A* **1587**, 239 (2019).
21. Weber B. M., Walsh P., Harynyuk J. J.: *Anal. Chem.* **88**, 5809 (2016).
22. Schenk J., Mao J. X., Smuts J., Walsh P., Kroll P., Schug K. A.: *Anal. Chim. Acta* **945**, 1 (2016).
23. Bai L., Smuts J., Schenk J., Cochran J., Schug, K. A.: *Fuel* **214**, 521(2018).
24. Liu H., Raffin G., Trutt G., Dugas V., Demesmay C., Randon J.: *J. Chromatogr. A* **1595**, 174 (2019).
25. Weatherly C. A., Zhang Y., Smuts J. P., Fan H., Xu C., Schug K. A., Lang J. C., Armstrong D. W.: *J. Agric. Food Chem.* **64**, 1422 (2016).
26. Fan H., Smuts J., Bai L., Walsh P., Armstrong D. W., Schug K. A.: *Food Chem.* **194**, 265 (2016).
27. Pechancová R., Qiu C., Smuts J., Lemr K., Schug K. A.: *J. Sep. Sci.* **42**, 556 (2019).
28. Qiu C., Smuts J., Schug K. A.: *J. Sep. Sci.* **40**, 869 (2017).
29. Hodgson A., Cochran J.: *J. AOAC Int.* **102**, 655 (2019).
30. Santos I. C., Smuts J., Schug, K. A.: *Food Anal. Methods* **10**, 4068 (2017).
31. Anthony I. G. M., Brantley M. R., Gaw C. A., Floyd A. R., Solouki T.: *Anal. Chem.* **90**, 4878 (2018).
32. Anthony I. G. M., Brantley M. R., Floyd A. R., Gaw C. A., Solouki T.: *Anal. Chem.* **90**, 12307 (2018).
33. Gruber B., Groeger T., Harrison D., Zimmermann R.: *J. Chromatogr. A* **1464**, 141(2016).
34. Santos I. C., Smuts J., Choi W. S., Kim Y., Kim S. B., Schug K. A.: *Talanta* **182**, 536 (2018).
35. Schenk J., Nagy B., Pohl N. L. B., Leghissa A., Smuts J., Schug K. A.: *J. Chromatogr. A* **1513**, 210 (2017).
36. Zheng J., Huang C., Wang S.: *J. Chromatogr. A* **1567**, 185 (2018).
37. Muthal A. P.: *Dissertation*. Seton Hall University, New Jersey, USA 2017.
38. Roberson Z. R., Goodpaster J. V.: *Forensic Chem.* **2019**, 15.
39. Kranenburg, R. F., García-Cicourel A. R., Kukurin K., Janssen H. G., Schoenmakers P. J., van Asten A. C.: *Forensic Sci. Int.* **2019**, 302.
40. Leghissa A., Smuts J., Qiu C., Hildenbrand Z. L., Schug K. A.: *Sep. Sci. Plus* **1**, 37 (2018).
41. Leghissa A., Hildenbrand Z. L., Schug, K. A.: *J. Sep. Sci.* **41**, 398 (2018).
42. Buchalter S., Marginean I., Yohannan J., Lurie I. S.: *J. Chromatogr. A* **1596**, 183 (2019).
43. Cruse C. A., Goodpaster J. V.: *Talanta* **195**, 580 (2019).
44. Reiss R., Gruber B., Klingbeil S., Gröger T., Ehlert S., Zimmermann R.: *Spectrochim. Acta. A* **219**, 129 (2019).
45. Qiu C., Cochran J., Smuts J., Walsh P., Schug, K. A.: *J. Chromatogr. A* **1490**, 191 (2017).
46. Drozd G. T., Worton D. R., Aeppli C., Reddy C. M., Zhang H., Variano E., Goldstein A. H.: *J. Geophys. Res. Ocean.* **120**, 7300 (2015).
47. Drozd G. T. a 10 spoluautorov: *Environ. Sci. Technol.* **53**, 1706 (2019).
48. Schenk J., Carlton Jr. D. D., Smuts J., Cochran J., Shear L., Hanna T., Durham D., Cooper C., Schug K. A.: *Environ. Sci-Proc. Imp.* **21**, 21423 (2019).
49. Santos I. C., Chaumette A., Smuts J., Hildenbrand Z. L., Schug, K. A.: *Environ. Sci-Proc. Imp.* **21**, 269 (2019).
50. Ponduru T. T., Qiu C. L., Mao J. X., Leghissa A., Smuts J., Schug K. A., Dias H. V. R.: *New J. Chem.* **42**, 19442 (2018).
51. Weston C., Smuts J., Mao J. X., Schug, K. A.: *Talanta* **177**, 41 (2018).
52. Shear-Laude L.: *LCGC* **13**, 9 (2017).

E. Škultěty, T. Pluháček, and V. Havlíček (*Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic*): **Separation of Isomeric Compounds by Vacuum UV Detector**

Although mass spectrometry has been utilized in a variety of applications, some limitations do exist where isomeric, isobaric, small, labile, or co-eluting compounds are analyzed. In this paper, a vacuum ultraviolet spectroscopy detector for gas chromatography (GC-VUV) is reviewed. The instrumentation is capable of quantitative and qualitative analysis of a wide variety of chemical compounds including hydrocarbons, permanent gases, fatty acids, pesticides, polychlorinated biphenyls, estrogens, explosives, psychoactive substances, and photoinitiators.

Many chemical substances absorb UV radiation, have characteristic absorption cross-sections in the gas phase at a wavelength of 120–240 nm and can yield a unique absorption spectrum. Compound characterization thus can be accomplished by matching the captured VUV spectrum against the library of reference spectra. A potentially useful feature is the ability to deconvolute overlapping signals and to discriminate co-eluting analytes. If the VUV absorption cross-sections for chemical compounds are known, the accurate number of molecules in the detector (even without calibration) can be determined from the absorption signal.

Keywords: vacuum ultraviolet detector, resolution, isomer, coelution

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (LO1509).