

OPTICKÁ SPEKTROSKOPIE PRO ANALÝZU POMĚRU STABILNÍCH ISOTOPŮ. KONKURENCE NEBO ALTERNATIVA KE KONVENČNÍ HMOTOVÉ SPEKTROSKOPII STABILNÍCH ISOTOPŮ (IRMS)?

JIŘÍ KUBÁSEK

Ruská 627, Choceň
jirkak79@gmail.com

Došlo 11.2.15, přepracováno 1.12.15, přijato 3.12.15.

Klíčová slova: stabilní isotopy, frakcionace, laditelný laser, spektrometrie, biochemie, mikrometeorologie

Obsah

1. Úvod
2. Účel měření poměru stabilních isotopů
3. Základní principy metod pro měření obsahu stabilních isotopů
 - 3.1. Metody využívající širokospektrální zdroje záření
 - 3.2. Metody využívající koherentní zdroje – lasery
4. Přesnost a další základní vlastnosti dostupných zařízení
5. Aplikace
 - 5.1. Isotopy methanu
 - 5.2. Isotopy CO₂ ve vydechovaném vzduchu jako (lékařský) diagnostický nástroj
 - 5.3. Toky mezi atmosférou a biosférou
 - 5.4. Isotopové efekty dýchání a fotorespirace
 - 5.5. Frakcionace isotopů uhlíku během fotosyntézy
 - 5.6. Isotopy vody
6. Soupeří nebo alternativa k IRMS?
7. Osobní zkušenost autora

1. Úvod

V tomto minipřehledu se pokusím (technicky i aplikačně) představit metody laserové spektroskopie ve službách stanovení poměru stabilních isotopů pro biologické a mikrometeorologické aplikace. Přestože přehledové články na toto téma existují^{1–4}, článek typu podobně širokého aplikačně – technického srovnání v anglické ani české literatuře není. Optické metody zaznamenávají v posledních dvou dekádách prudký rozmach. Díky technickým pokrokům jsou dnes v mnohém srovnatelné s IRMS (isotope ratio mass spectrometry), přičemž tuto standardně používanou metodiku předčí v rychlosti/frekvenci měření. Umožňují tedy vhléd i do vysoce dynamických chemických, meteorologických a biologických procesů, kde IRMS z velké části dosáhla meze svých možností^{5,6}. Další nezanedbatelné výhody (ale i nevýhody) se pokusím kriticky zhodnotit v dalším textu.

2. Účel měření poměru stabilních isotopů

Stabilní isotopy (SI) se staly velmi cenným až nezastupitelným pomocníkem v řadě oborů od základního výzkumu až po průmysl a legislativu. Můžeme využívat přirozené isotopové selektivity chemických a biologických procesů k jejich popisu a kvantifikaci. Celníci takto mohou určit geografický původ výrobku (voda, víno, slonovina, krunýče želv...) či jejich pravost. Např. zda jsou rum či tequila opravdu vyrobeny z cukrové třtiny či agáve (jak je předepsáno), které mají díky svému typu fotosyntézy charakteristický isotopový poměr uhlíku ¹³C/¹²C.

Druhým používaným přístupem je značení minoritním isotopem a sledování jeho putování v systému. Takto dnes lékaři s vysokou pravděpodobností odhalí žaludeční vředy naprosto neinvazivně, jak bude dále vysvětleno. Aplikací SI je mnohem více, ale přesahují rámec tohoto článku. Tento dvouodstavec měl za úkol zdůraznit aplikační potenciál SI.

3. Základní principy metod pro měření obsahu stabilních isotopů

Klasická isotopová poměrová hmotová spektrometrie (IRMS) na základě rozdílné hmoty molekul s různými isotopy daného prvku (tj. isotopologie) zakřívuje v magnetickém poli dráhy urychlených iontů a vzniklé oddělené svazky dopadají ve vysokém vakuu do oddělených kolektorů, kde vytvářejí elektrický proud řádu nA. Ten je přesně měřen a hodnoty digitalizovány. Koncept této nejrozšířenější techniky „magnetic sector IRMS“ se vyznačuje nízkým hmotovým rozlišením (většinou kolem 110) a extrémně vysokou citlivostí (dektekční limit řádu tisícovky dopadlých iontů). Díky tomu je tato metoda schopna velmi přesně vyčíslit podíl v množství stabilních isotopů ve srovnávaných vzorcích (každý z nich velmi přesně porovnává vůči danému standardu). Nevýhodou je neschopnost (díky nízkému rozlišení) rozlišit kontaminující ionty s nepatrně odlišnou hmotou (např. ¹²C¹⁶O¹⁶O a ¹⁴N¹⁴N¹⁶O – obojí *M_r* přibližně 44). Pro tyto tzv. isobaričké interference se zavádějí různé (většinou empirické) korekce vedoucí k dosažení přesnějších isotopových poměrů námi sledovaných molekul (tedy bez vlivu interference)². Pro ilustraci požadované přesnosti isotopových technik uveďme, že poměr ¹³CO₂/¹²CO₂ v současné atmosféře činí 0,01115 zatímco ¹³C/¹²C v typické C₃ rostlinné biomase 0,01095 (cit.⁷). V prvním případě tedy připadá 1115 atomů těžkého uhlíku ¹³C na 100 000 atomů ¹²C, ve druhém „pouze“ 1095 (rozdíl tedy činí 20 ¹³C na 100 000 běžnějších ¹²C). Protože většinou sledujeme rozdíly ještě menší (právě na uvedeném rozsahu se většinou pohybuje frakcionace – nestejněměrné využívání různých isotopolo-

gů – většiny zájmových procesů), požadovaná přesnost detekce je vyšší. Metodiky na bázi IRMS dále vyžadují přídatná zařízení pro dosažení kvalitního vakua ($p < 1 \cdot 10^{-4}$ Pa), k přípravě (zakoncentrování) vzorků, a jejich dávkování do vakuové části IRMS (cit.⁶).

Metody založené na optické spektrometrii. Na rozdíl od IRMS, optické spektrometry mohou přímo měřit koncentrace isotopologů (např. $^{13}\text{CO}_2$, $^{12}\text{CO}_2$), při jejich atmosférické koncentraci (nepotřebují proto často separační a koncentrační techniky přípravy vzorků), neohroží je obsah vodní páry a měří také většinou s mnohem vyšší frekvencí než IRMS (cit.⁷). Přestože optická spektroskopie je dnes velmi široký obor, v analýze stabilních isotopů (rozlišení isotopomerů) se uplatňuje omezené množství technik. Téměř všechny spadají do oblasti infračervené spektroskopie (IR), neboť většina rotačně-vibračních přechodů molekul se projevuje výraznou absorpcí právě v infračervené oblasti, v rozsahu vlnových délek cca 1 až 20 μm (10 000 až 500 cm^{-1}). Fundamentální absorpční pásy většinou leží ve střední infračervené oblasti (MIR, $\lambda > 2,5 \mu\text{m}$), zatímco kombinační pásy a tzv. overtóny pak v blízké infračervené (NIR, $\lambda = 0,8$ až $2,5 \mu\text{m}$). Uvádí se, že fundamentální pásy bývají oproti zbývajícím asi 50 až 500× intenzivnější, a tedy velmi vhodné pro měření v nízkých koncentracích plynů ve vzorku (atmosférické koncentrace CO_2 , CH_4 ; NO_2 jsou cca 400; 1,9 a 0,33 $\mu\text{mol mol}^{-1}$). Komplikujícím faktorem naopak je omezená dostupnost vhodných zdrojů záření a celkově složitější design přístrojů (např. potřeba kryogenních podmínek, viz dále)^{7,8}.

3.1. Metody využívající širokospektrální zdroje záření

FTIR (fourier-transform infrared) spektrometrie využívá IR zdroj, který spojitě pokrývá celé sledované spektrum (většinou zdroj na principu vyzařování černého tělesa tedy „podžhavená žárovka“). Svazek paprsků prochází tzv. Michelsonovým interferometrem. Tam dochází k interferenci dvou paprsků, přičemž dráha jednoho se mění změnou polohy pohyblivého se zrcadla (čím vyšší rozlišení je vyžadováno, tím delší je dráha zrcadla). Výsledným záznamem je interference přímého paprsku a absorbovaného světla procházejícího měřeným vzorkem ve zvoleném spektrálním rozsahu. Intenzita je zaznamenávána jako funkce polohy pohyblivého zrcadla. Takto vzniklý interferogram je dále pomocí Fourierovy transformace převeden na absorpční spektrum. Výhodou FTIR techniky je, že v každém bodě interferogramu je vždy měřena informace o celém výsledném spektru najednou. Spektrální rozlišení výsledného spektra je dáno počtem měřených bodů v interferogramu. Tedy, čím je větší optická dráha zrcadla při snímání interferogramu, tím má výsledné spektrum větší spektrální rozlišení (ale také delší čas jednoho skenu). Spektrální rozsah je při této technice definován pouze spektrální šířkou použitého detektoru. Výsledné spektrum je tedy spektrálně velice široké, běžně je možné například v infračervené oblasti s InSb detekto-

rem detegovat spektra v rozsahu 1900–10 000 cm^{-1} i při maximálním rozlišení interferometru danou jeho konstrukcí. Na rozdíl od všech následně pojednávaných metod tedy FTIR technika umožňuje současně najednou měřit spektra celé řady molekul a isotopologů, které jsou přítomny ve zkoumaném vzorku, (např. v IR spektrální oblasti to mohou být absorpční pásy CO_2 , vody, methanu, oxidů dusíku, organických pulutantů a mnohé další). Přestože FTIR nikdy nebyla metoda primárně určená pro isotopová měření, bylo již dosaženo výborných výsledků, jak bude ještě v aplikační oblasti ukázáno^{9–12}.

3.2. Metody využívající koherentní zdroje – lasery

Na rozdíl od FTIR, laserové metody lze aplikovat pouze na úzkou část spektra^{7,8}. Zlomový pro isotopové techniky nejspíše byl objev laditelných laserů, např. laditelných laserových diod (TDL) a jejich různých typů (zejména tzv. kvantově kaskádové lasery (QCL))¹³. Obecně je snaha měřit absorpci v oblasti fundamentálních rotačně vibračních pásů molekul, které leží většinou v MIR, neboť pouze tyto mají dostatečnou intenzitu (a lze tedy dosáhnout dostatečné citlivosti měření pro zředěné plyny při přijatelné délce optické cesty). Uvedme také, že laditelné lasery mají vždy jen omezený rozsah přeladění (většinou jednotky až desítky cm^{-1}). Tento rozsah je omezující pro současné stanovování více molekul. Pro stanovování isotopologů téže molekuly bývá limitující často jiná skutečnost: Absorpční čáry vybrané pro nejlepší rozlišení isotopomerů často leží velmi blízko u sebe (např. jako optimální byly vybrány čáry 2299,64 cm^{-1} pro $^{12}\text{CO}_2$ a 2299,79 cm^{-1} pro $^{13}\text{CO}_2$). Proto je většinou nutné měřit při sníženém tlaku (2–20 % atmosférického tlaku) pro zabránění kolizního rozšiřování a překryvu spektrálních čar⁷.

Velmi výhodné vlastnosti (co se týká čistoty spektra, stability a přeladitelnosti) mají tzv. „lead-salt tunable diodes“, které bohužel pro oblast MIR vyžadují kryogenní podmínky (teploty kapalného dusíku, $t = -196^\circ\text{C}$ či nižší). Doposud se nepodařilo vyrobit srovnatelný ekvivalent, který by plnil všechny náročné požadavky a pracoval při pokojové nebo lehce snížené teplotě (dosažitelné polovodičovým chlazením). Telekomunikační diody se ukázaly být velmi vhodným přeladitelným zdrojem pro oblast NIR. Protože v této oblasti sídlí overtóny a kombinační pásy mají řádově nižší absorbanci než fundamentální pásy, je oblast NIR úspěšně využívána zejména v technikách zvyšujících délku efektivní optické cesty vzorkem, např. CRDS (viz dále)⁷. Posledním z řady diodových laserových zdrojů, které pro svou úspěšnost v isotopových technikách uvedu, jsou mnohovrstevné kvantově kaskádové lasery (QCL). Jde o velmi výkonné koherentní přeladitelné zdroje, které bývaly dříve pouze pulzními lasery; nyní začínají být pro oblast MIR dostupné i jako zdroje kontinuální. Jsou stále velmi drahé, ale umožňují konstrukci velmi precizních isotopových zařízení¹³. V souvislosti s isotopovou přesností uvedme, že vlastní šum laseru a detektorů bývá u dobře navržených systémů menším

příspěvkem k celkové nestabilitě. Za největší a nejhůře korigovatelný je považován tzv. optický šum⁷. Ten pochází z nestejných vlastností optických cest (vibrace, tepelná roztažnost) a nehomogenity a časové nesynchronity měřených a referenčních vzorků.

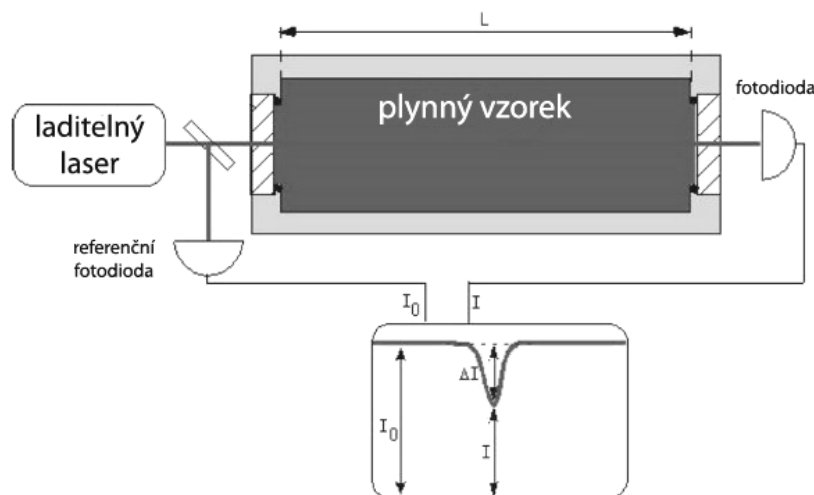
TDLAS (z angl. tunable-diode laser absorption spectrometry, obr. 1) tedy využívá TDL a většinou jedno-průchodovou optickou cestu (obvykle zdvojenou pro referenční a vzorkovaný plyn). Protože přeladění laserové diody může být velmi rychlé, umožňují TDLAS měřit relativní (a po kalibraci isotopovým standardem i absolutní) zastoupení isotopologů v plynném vzorku mnohokrát za sekundu¹. Samostatnou kapitolou, která ovšem přesahuje rámec tohoto přehledového textu, jsou metody detekce vzorkem modifikovaného záření. Uvedme, že právě čeští vědci adaptovali optoakustickou detekční metodu, kdy použitím skleněné i kovové rezonanční kyvety a cenově výhodných elektretových mikrofonů dosáhli v NIR i MIR srovnatelný detekční limit koncentrací (NH_3 , CO_2) jako v případě přímé absorpční detekce (kryogenně pracujícího InSb detektoru)¹⁴.

Laditelný, většinou v NIR oblasti pracující laser využívají i zařízení CRDS (z angl. cavity ring-down spectrometry, obr. 2). Zde je ovšem optická cesta prodloužena až na efektivní délku několika kilometrů mnohonásobným odrazem paprsku mezi vysoce odrazivými zrcadly (odrazivost > 99,99 %) umístěnými na koncích měřicí optické kyvety. Neměří se zde absorbance během doby, kdy je laser aktivní, ale rychlost „vyhasínání paprsku“ po

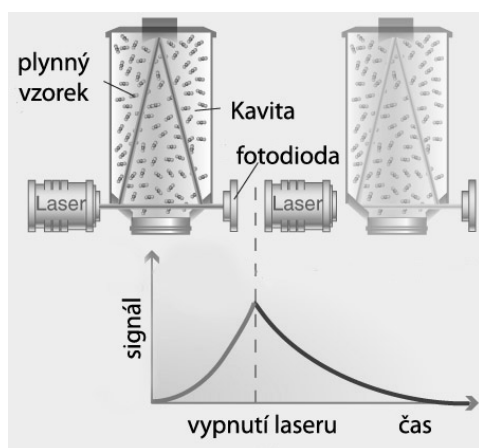
vypnutí laseru. Čím vyšší koncentraci (a tedy absorbanci) má vzorek v optické cestě, tím menší počet průchodů paprsku mezi zrcadly je třeba ke stanovenému poklesu intenzity³. Podobně jako u TDLAS lze přeladčováním laseru postupně měřit dva nebo dokonce několik isotopologů. Díky obrovské zdánlivé délce optické cesty je tato metoda zvláště vhodná pro měření absorbance v oblasti kombinálních pásů a overtonů, které bývají přibližně o dva řády slabší, než fundamentální rotačně vibrační pásy. Tyto slabší absorpční oblasti leží u řady důležitých molekul (CO_2) v oblasti NIR, pro kterou existují levné přeladitelné laserové zdroje (telekomunikační diody), které nevyžadují kryogenní teploty. Přesnost CRDS pro isotopové analýzy se však pro daný čas integrace zdá být u současných zařízení nižší než u dalších srovnávaných metod (viz dále).

4. Přesnost a další základní vlastnosti dostupných zařízení

Fourierovu transformaci využívající infračervená spektroskopie (FTIR) dosáhla interní přesnosti 0,1 ‰ pro $\delta^{13}\text{C}$ pro 2min integrační čas a atmosférickou $[\text{CO}_2]$ ^{9,10}. Tato hodnota je pro řadu aplikací plně dostačující. Přesto je třeba zdůraznit, že citované práce adaptovaly komerční FTIR spektrometr, který není primárně určen pro isotopové analýzy. To vyžaduje značný technický, matematický a IT vklad.



Obr. 1. Zjednodušené schéma spektrometru využívajícího princip laditelné laserové diody (TDLAS). Paprsek diody je rozdělen na dva, jejichž intenzity jsou vzájemně porovnávány. Výstupní proud (I_0) je úměrný intenzitě referenčního paprsku. Jeho intenzita může driftovat s časem v závislosti na teplotě a dalších proměnných. Paprsek procházející vzorkem je, kromě předcházejících faktorů, ovlivňován koncentrací měřeného vzorku a délkou optické dráhy L . Jeho výsledkem je elektrický proud (I). ΔI je úměrná koncentraci měřeného izotopomeru. Skutečná soudoba TDLAS zařízení jsou značně složitější, obsahují, mimo jiné, téměř vždy zdvojenou optickou cestu (pro referenční a měřený vzorek) a digitálně analogové a analogově digitální převodníky. Upraveno podle: <http://www.americanlaboratory.com/>



Obr. 2. Zjednodušené schéma spektrometru využívajícího princip „Cavity ring-down“ (CRDS). Měřtkem koncentrace je zde rychlost poklesu intenzity paprsku v optické kyvetě uzavřené vysoceodraznými zrcadly poté, co je laser vypnut. V případě, že je kyveta vzorku prázdná, pokles probíhá nejpomaleji a závisí především na odrazivosti zrcadel. Absorbance vzorku vede k urychlení extinkce odrážejícího se paprsku. Bližší viz text. Upraveno podle: http://www.picarro.com/assets/images/content/cavity_figure_large.jpg

V roce 1992 udávaná přesnost TDLAS 4 ‰ pro $\delta^{13}\text{C}$ v atmosférickém CO_2 (podrobněji o udávání přesnosti isotopových analýz, viz terminologie níže) nebyla dostačující pro biologický nebo atmosférický výzkum⁴. V průběhu 10 let, Bowling a spol. uzpůsobili na TDLAS založený analyzátor stopových plynů (TGA 100, Campbell Scientific, Logan, UT, USA) pro měření poměru isotopů uhlíku, kyslíku a vodíku v CO_2 a v H_2O (cit.¹⁵). Na tomto uzpůsobeném analyzátoru byla pak provedena řada isotopových měření v mnoha laboratořích i v terénu.

I dnešní TDLAS mají horší interní přesnost (typicky 0,5 ‰, 1,5 ‰ a 8 ‰ pro $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ a δD pro 100 ms integrační čas (TGA200A, Campbell Scientific)), než moderní IRMS (typicky 0,02–0,1 ‰ pro $\delta^{13}\text{C}$). Na druhou stranu vysoká frekvence měření (500 Hz v případě TGA200A; obecně lze ovšem TDL modulovat frekvencí 10 kHz i více) umožňuje průměrováním zužovat intervaly spolehlivosti a tím výrazně snižovat naši nejistotu (výše uvedený šum je pro 100 ms průměry, tedy pro průměry z 50 primárních hodnot získávaných 500× za sekundu). Během času, kdy IRMS chromatograficky zakoncentruje CO_2 a vytvoří jednu hodnotu isotopových poměrů (2 až 6 min), poskytne TDLAS laserové zařízení stovky (již průměrovaných) hodnot. Z těchto lze spočítat velmi robustní průměr za předpokladu, že variabilitu tvoří jen náhodný šum. Tento předpoklad ovšem nebývá často splněn: TDLAS může driftovat s časem (více než IRMS) a je citlivější na změny teplot, koncentraci měřených plynů a jejich vlhkost (viz kapitola „Osobní zkušenost autora“).

Dnešní CRDS zařízení deklarují podobnou nebo lepší přesnost pro $\delta^{13}\text{C}$ jako TDLAS (ale pozor: pro mnohem

delší průměrovací časy, většinou 2 až 5 min; maximální rychlost čtení bývá také nižší): 0,1 ‰ při 5 min/0,5 Hz – G2131-i (Picarro Inc., Santa Clara, USA), 0,1 ‰ při 5 min/1 Hz – CCIA-36d a 0,08 ‰ při 2 min/5 Hz – CCIA-46r (Los Gatos Research, Mountain View, USA). Obdobně jako TDLAS, i tato zařízení mají horší dlouhodobou stabilitu (ve srovnání s IRMS) a vyžadují pravidelnou kalibraci pomocí referenčních plynů se známým isotopovým poměrem¹⁵. Velkou výhodou pro terénní měření je skutečnost, že CRDS (na rozdíl od původních TDLAS) nevyžadují k chlazení kapalný dusík (toto omezení však společnost Campbell Scientific u nejnovějšího modelu TGA 200A odstranila chlazením laseru Peltierovým článkem; jaký laser, který nevyžaduje kryogenní podmínky, použila, ovšem firma neuvádí). TDLAS i CRDS získaly rychle popularitu díky přijatelné ceně, rozměrům a hospodárnosti provozu.

Nejvyšší preciznosti dnes dosahují zařízení založená na kvantově kaskádních laserech¹³ (QCL), kde výrobce Aerodyne Research (45 Manning Road Billerica, MA, USA) udává přesnost 0,1 ‰ pro $\delta^{13}\text{C}$ v atmosférickém $[\text{CO}_2]$ pro frekvenci měření 1 Hz a dokonce 0,03 ‰ při 100 s průměrování (0,01 Hz). Tato hodnota je již plně srovnatelná s IRMS. Vzhledem k vysoké ceně zařízení a tomu, že je nabízeno poměrně krátkou dobu, je počet aplikačních prací dosud omezený.

5. Aplikace

Podobně jako IRMS i optické metody jsou nyní běžně používány v nebiologickém výzkumu i v biologických aplikacích s tím, že isotopové analýzy jsou jen menším aplikačním polem laserových a FTIR spektrometrů (převažují aplikace pro přesné měření koncentrací stopových plynů¹⁶).

5.1. Isotopy methanu

Porozumění geobiochemickému cyklu methanu (CH_4) jako významného skleníkového plynu (v současné době v atmosféře Země tvoří methan asi 19 % síly skleníkového efektu)¹² nám pomůže předpovídat jeho emise a atmosférické koncentrace v budoucnu. Protože různé mechanismy produkce a spotřeby methanu se liší svou „isotopovou vybíravostí“, můžeme často isotopovými měřeními kvantifikovat jednotlivé procesy a jejich globální význam. Isotopy uhlíku a vodíku v CH_4 byly zkoumány metodou TDLAS již v 90. letech 20. století^{17,18}. Bylo zapotřebí koncentrace CH_4 50 až 2000 ppmv (ve vzduchu je kolem 2 ppmv) pro přímou analýzu $\delta^{13}\text{C}$ a δD . Naopak koncentrace CH_4 (nikoli poměr isotopů) bylo možno pomocí TDLAS měřit s přesností 1 ‰ už pro koncentraci 20 ppbv (0,02 ppmv)¹⁶. CRDS spektrometry však v současné době měří $\delta^{13}\text{C}$ v CH_4 už při jeho atmosférické koncentraci^{19,20}. Elegantní a prakticky významnou aplikací TDLAS a CRDS je hledání a nacházení úniků zemního plynu (CH_4 je hlavní složkou zemního plynu) z plynovodů na základě

odlišného $\delta^{13}\text{C}$ methanu v distribuovaném plynu a ve volné atmosféře²¹. Takto mnohdy byla zjištěna řádově zvýšená koncentrace CH_4 (v porovnání s přírodním pozadím) podél plynovodů a v aglomeracích velkoměst v důsledku úniků zemního plynu z rozvodů.

5.2. Isotopy CO_2 ve vydechovaném vzduchu jako (lékařský) diagnostický nástroj

Měření $\delta^{13}\text{C}$ ve vydechovaném CO_2 je nejspíše první biologická aplikace TDLAS²². Bakterie *Helicobacter pylori*, která umí využívat močovinu jako zdroj dusíku (a CO_2 uvolňuje do krevního oběhu) se velmi často vyskytuje u pacientů s peptickými vředy. Podáme-li pacientovi perorálně ^{13}C značenou močovinu, můžeme – v případě jejího metabolického štěpení *H. pylori* – těžký isotop ve zvýšeném množství detegovat ve vydechovaném vzduchu již krátce (20 min) po podání značené močoviny. Vzhledem k vysoké koncentraci CO_2 v dechu (cca 5 %), lze konstruovat lehké, levné a uživatelsky přívětivé spektrometry na bázi TDLAS mající dostatečnou přesnost^{23,24}. Také technologie CRDS byla úspěšně použita pro výše uvedené lékařské účely s vyhovující přesností $\delta^{13}\text{C}$; 0,22 ‰ (cit.^{3,25}). TDLAS též obstála při „dechové isotopové analýze“ hmyzích býložravců – sarančete. Isotopové složení tohoto dechu i celého těla býložravce dobře korelovalo s jeho stravou (C_3 a C_4 rostliny)²⁴.

5.3. Toky mezi atmosférou a biosférou

Současný pokrok v přesnosti a stabilitě laserových zařízení umožnil aplikace, které byly doposud možné pouze s použitím IRMS. Isotopové toky CO_2 v atmosféře, prvně laserovým spektrometrem měřili Bowling a spol. analyzátoři TGA 100 (Campbell Scientific, Logan, UT, USA), původně určeným pro měření koncentrací stopových plynů¹⁵. Četné další práce následně používaly tuto instrumentaci a metodiku^{26–30}. Kombinace TDLAS s měřicí frekvencí >10 Hz a mikrometeorologických technik (3D anemometrie) je velmi výhodná pro sledování toků CO_2 , vody a jejich isotopologů mezi atmosférou a porostem/půdou v reálném čase^{26,27,29,31}. Požadovanou rychlostí isotopových měření zde plně vyhovují QCL¹³ a slibně se jí svou hodnotou 5 Hz blíží i nejnovější CRDS zařízení CCIA-46r společnosti Los Gatos Research, (Mountain View, USA). Mnohá z těchto rychlých měření odkrývají nové poznatky o krátkodobých změnách isotopových toků, které nemohly být zjištěny pomocí IRMS (viz další kapitola).

5.4. Isotopové efekty dýchání a fotorespirace

Jak a proč dýchání a fotorespirace rostlin upřednostňují různé stabilní isotopy zůstávalo po dlouhý čas záhadou. Přitom toto poznání může být klíčem k odhalení různých metabolických cest, účasti enzymů a jejich termodynamických zákonitostí. IRMS studie byly schopny odhalit jistou úhrnnou frakcionaci^{32,33}; avšak krátkodobé a pře-

chodné efekty zůstávaly skryty (setřeny nedostatečným časovým rozlišením). Například obohacení $^{13}\text{C}\text{CO}_2$ ve vydechovaném vzduchu v prvních minutách po zatemnění listu/rostliny bylo pozorováno až prostřednictvím TDLAS³⁴. Tento rychlý, metabolicky podmíněný trend, byl později pozorován i na ekosystémové úrovni³⁵. Laserové techniky odhalily také velké a dynamické změny v zastoupení isotopů kyslíku v respirovaném CO_2 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$, $\delta^{18}\text{O}$, které pro technickou náročnost sleduje jen málo studií) v průběhu zatemnění^{36,37}.

TDLAS pomocí isotopového značení fotosyntetizujících listů umožnilo zjištění rychlosti a míry přenosu aktuálních asimilátů do kořenů a do půdy. Ukázalo se, že mikrobiální respirace velmi rychle mění svůj isotopový signál právě díky zpracovávání recentních asimilátů vylučovaných kořeny rostlin, které byly vytvořeny z isotopově značeného CO_2 (cit.³⁸). Silný a okamžitý byl také vliv závlahy na množství emitovaného CO_2 z půdy (díky aktivaci mikrobiálního metabolismu) a na jeho $\delta^{13}\text{C}$ a $\delta^{18}\text{O}$ (cit.³⁹). Rychlost změny $\delta^{13}\text{C}$ v CO_2 vydechovaném kmenem po ^{13}C značení v oblasti koruny byla zase dobrým měřítkem rychlosti floémového transportu (rychlost exportu organických látek z listů prostřednictvím lýka)⁴⁰.

Přestože neexistuje mnoho prací, které přímo srovnávají IRMS, TDLAS a CRDS technologie pro stejné typy isotopových analýz, existuje cenné srovnání všech tří zmíněných metod ve spojení s půdními respiračními komorami⁵.

5.5. Frakcionace isotopů uhlíku během fotosyntézy

Na rozdíl od dýchání, kde je ve hře stále řada neznámých, teorie $\delta^{13}\text{C}$ frakcionace během C_3 a C_4 fotosyntézy je dobře teoreticky formulována. Známé teoretické zákonitosti tak mohou být, v případě dostatečně spolehlivých isotopových měření, prakticky dobře uchopeny. Jednou z technicky nejnáročnějších aplikací je „on-line“ měření frakcionace ^{13}C a ^{18}O během fotosyntézy listů. Obvykle dochází k menší než 1 ‰ změně $\delta^{13}\text{C}$ mezi vstupním a výstupním (listem ovlivněným) CO_2 , která musí být měřena s řádově ještě větší přesností. Správné zjištění tohoto rozdílu s dostatečným časovým rozlišením přitom může pomoci s řešením dvou velmi aktuálních témat současného výzkumu fotosyntézy; obě byly již úspěšně řešeny s použitím TDLAS: 1) vyčíslení difuzního odporu pro CO_2 a prokázání jeho rychlých změn v souvislosti s intenzitou světla a koncentrací CO_2 , což bylo pomocí IRMS prokázáno jen částečně^{41–44}; 2) odhad netěsnosti pochev cévních svazků u C_4 rostlin (rostlin s koncentračním mechanismem CO_2), např. u zemědělsky velmi významné kukuřice⁴⁵.

5.6. Isotopy vody

Také zastoupení deuteria (D , ^2H) a těžkého kyslíku (^{18}O) ve vodě může být dnes měřeno přesně a rychle optickými metodami. Takovéto výsledky mohou pomoci nejen při sledování koloběhu vody v biosféře^{46–48}, ale mohou také přiblížit geografický původ výrobků s vysokým obsahem původní vody (pivo, víno, mléko...) a odhalit paděl-

ky⁴⁹. Isotopy vody jsou nápomocny také při výzkumu vodního provozu rostlin a jejich vztahu k fotosyntéze^{50,51}. Výhodou proti IRMS zde je navíc zjednodušená příprava vzorku, neboť optické metody mohou měřit isotopy vodních par přímo, zatímco do IRMS voda ani vodní pára vstupovat nesmí (a je tedy ekvilibrována a isotopový signál přenášen s jiným plynem).

6. Soupeři nebo alternativa k IRMS?

Poměrová hmotnostní spektrometrie lehkých isotopů (IRMS) bývá dnes často používána. Její přesnost (<0,01 % v konfiguraci „dual-inlet“) a stabilita nemůže být nyní dosažena alternativními přístupy⁶. IRMS je také bezkonkurenčně nejcitlivější metodou. Pro analýzu (CO₂) postačí často méně než 1 ml atmosférického vzduchu, zatímco dnešní laserové metody vyžadují desítky až stovky mililitrů⁶. Při přímém vzorkování vzduchu však tato vlastnost nebývá omezující. Na druhou stranu IRMS přináší mnohá omezení: 1) neschopnost rozlišovat isotopomery se stejným hmotnostním číslem (např. ¹²C¹⁶O¹⁶O od ¹⁴N₂¹⁶O jako kontaminantu, oba mají cca 44 Da), 2) pomalost a integrativní povahu analýzy díky chromatografické přípravě vzorku, 3) nutné periferie pro odběr vzorků a přípravu ke vstupu do vakuové části IRMS, 4) IRMS instrumentace je velká, těžká, má vysokou spotřebu elektrické energie, plynů a vyžaduje termostatovanou místnost, 5) neschopnost měřit přímo isotopy ve vodě. Většinu zmíněných nedostatků již překonaly právě zmíněné optické metody. Navíc zařízení, která je využívají, se již nyní lépe hodí pro použití v terénu a jsou méně nákladná jak na provoz, tak na odbornost obsluhy. Bohužel, stále není dostatek prací (publikovaných v dostupných a důvěryhodných periodikách), které srovnávají IRMS a alternativní metody pro identické analýzy. Midwood a Millard přímo srovnávali IRMS, TDLAS a CRDS pro půdní respiraci a uzavírají: „přenosnými TDLAS a CRDS systémy se otevřela možnost měření δ¹³C v reálném čase, což umožňuje nové možnosti výzkumu a zodpovězení nových výzkumných otázek“⁵.

CRDS byl také srovnáván s IRMS (režim „continuous flow“) pro vzorky vzduchu v lahvíčkách i pro přímé vzorkování okolní atmosféry. Závěr je velmi slibný: „Naše práce ukazuje, že systém CRDS je dostatečně flexibilní jak pro dávkovou analýzu vzorků, tak i pro kontinuální měření. Tato flexibilita rozšiřuje spektrum aplikací, ve kterých CRDS má potenciál nahradit klasický IRMS“⁵². Velmi recentní publikace pak přináší srovnání nově vyvinutého isotopového TDLAS a IRMS taktéž s velmi nadějnými výsledky⁶.

7. Osobní zkušenost autora

Měl jsem možnost uvádět do provozu a přibližně rok pracovat s recentním CRDS zařízením nejmenovaného výrobce. Poměr přesnost/šum pro pětiminutové průměrování dosahoval specifikací výrobce. Přesto jsme se stále

potýkali s dlouhodobým driftem (zařízení se částečně stabilizovalo až po 2–3 hodinách provozu) a závislostí měřeného isotopového poměru na koncentraci CO₂ a vlhkosti vzduchu. Tyto problémy se nepodařilo odstranit ani po nahrání nového firmware výrobcem. To znemožňuje úspěšně používat spektrometr pro terénní aplikace (např. ve spojení s půdními respiračními komorami, kde se koncentrace CO₂ a obsah vodní páry velmi mění), jak jsme zamýšleli. Proto je jistě vhodné, aby potenciální pořizovatel laserového isotopového spektrometru při výběru kontaktoval pracoviště, kde se dané zařízení rutinně používá a vyžádal si reference. Ty mohou být při výběru velmi cenným doplněním údajů výrobce. Při kontaktu s takovými pracovišti jsem získal informace o tom, že zařízení různých výrobců se liší mnohem více, než je zřejmé z oficiálních specifikací výrobce. Protože jde o dosti novou a tématicky úzkou technologickou oblast, bude asi třeba kontaktovat špičkovou zahraniční pracoviště řešící podobné otázky a provádějící podobné typy analýz.

Přestože IRMS pravděpodobně zůstane po jistý čas metodou volby pro tuhé a kapalně vzorky (pro nejvyšší požadované přesnosti a pro velmi malé vzorky), alternativní přístupy rychle získávají kompetenci a popularitu pro přesné isotopové analýzy plyných vzorků (CO₂, H₂O, CH₄ a dalších) při jejich přirozených koncentracích. Někteří výrobci navíc již nabízejí kompletní arzenál přídatných zařízení k přípravě (převedení do plyného skupenství) pevných a kapalných vzorků a jejich dávkování do svých CRDS spektrometrů, což zcela emuluje funkcionalitu IRMS (Piccaro Inc., Santa Clara, USA). O potenciálu a výhodách laserových technologií v porovnání s konvenční IRMS svědčí i záměr na jejich využití při budoucím isotopovém výzkumu atmosféry planety Mars⁵².

Závěrečný postřeh autora: Vědecké práce využívající IRMS běžně neuvádějí tuto metodu v názvu ani v abstraktu článků. Naopak publikace měřící pomocí alternativ (TDLAS, CRDS, FTIR) pravidelně inserují použitou optickou metodu, vědomi si inovativnosti svého přístupu.

Terminologie a zkratky

Stabilní isotopy – atomy, které mají stejný počet protonů, ale liší se v počtu neutronů (např. uhlík ¹²C má v jádře 6 protonů a 6 neutronů; ¹³C opět 6 protonů, ale k tomu 7 neutronů). Na rozdíl od jejich radioaktivních protějšků (např. ¹⁴C) u nich nedochází k radioaktivnímu rozpadu.

Isotopologie – molekuly, které se shodují v prvkovém složení, ale nikoli v přítomných isotopech (např. CO₂ může existovat ve více než 10 stabilních isotopologech, z nichž jsou nejčastější ¹²C¹⁶O¹⁶O, ¹³C¹⁶O¹⁶O a ¹²C¹⁸O¹⁶O).

Delta notace (δ) – Hodnoty δ udávají, jak hodně se isotopový poměr (poměr vzácnějšího k běžnějšímu isotopu) našeho vzorku liší od isotopového poměru mezinárodně zvoleného standardu a udává se nejčastěji v ‰. Dovolím si nyní zjednodušit, aby situace byla snadno pochopitelná i pro novice v oboru. Řekněme, že obsah těžkého uhlíku (¹³C) ve standardu je 1 ‰ (zbylých 99 ‰ činí ¹²C).

Pokud v našem vzorku je 1,01 % těžkého uhlíku (a 98,99 % lehkého), bude jeho $\delta^{13}\text{C}$ přibližně 10 ‰, pokud bude absolutní obsah ^{13}C 0,99 % (a 99,01 % ^{12}C), vyčíslené $\delta^{13}\text{C}$ se bude blížit hodnotě –10 ‰. Ve skutečnosti bude situace složitější, protože 1) standard neobsahuje přesně 1 % těžkého uhlíku a 2) s procenty a promile se musí počítat trochu složitěji (+100 % znamená dvojnásobek, zatímco –100 % znamená mnohonásobně méně, tedy nulu). V reálných vzorcích většinou stanovujeme rozdíly v hodnotách δ řádu jednotek až desítek ‰ (desetin až jednotek %) a uvedený aditivní přístup je blízký realitě. Uvedený příklad nám tak ukazuje, jak malé absolutní rozdíly isotopových poměrů stanovujeme a jak technicky náročné to je.

Udávání přesnosti isotopových zařízení. Většina výrobců udává jako měřítko přesnosti či šumu (angl. nejčastěji „precision“, někdy „noise“) 1 směrodatnou odchylku (SD) pro následně změřené hodnoty. Problém je, že tyto hodnoty nejsou (zejména v případě laserových metod) primárními daty, ale jsou již mnohdy průměrovány (výrobce by měl udávat, v jakém časovém intervalu). Nejistota určení průměru (střední chyba průměru, SEM) tak klesá s druhou odmocninou počtu pozorování, pokud je šum náhodný a není ovlivněn dlouhodobějšími trendy (časový drift, koncentrační závislost chyby měření, aj.). Potom pro nás orientační výpočet SEM přináší nejužitečnější informaci o dosažitelné přesnosti pro naše časové rozlišení.

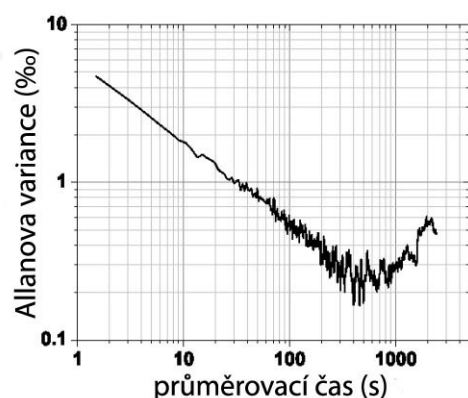
Uvedme si příklad. Výrobci uvádí (viz text), že model TDLAS dosahuje přesnosti 0,5 ‰ pro průměry získávané každých 100 ms, zatímco nejnovější model CRDS 0,08 ‰ pro 2 min průměry. Zdálo by se na první pohled, že CRDS je přesnější. Výpočtem SEM si ukážeme, že tomu tak není. Pro CRDS zůstává 2min průměr SEM 0,08 ‰ (protože přesnost je udávána pro tuto dobu integrace). TDLAS za stejnou dobu poskytne: $2 \times 60 \times 10 = 1200$ hodnot s garantovanou přesností 0,5 ‰. Pro TDLAS

tedy SEM klesne v poměru $0,5/1200^{(1/2)} = 0,014$ ‰.

Tento výpočet nezohledňuje dlouhodobé trendy. Právě tyto se většinou po minutách až hodinách (záleží na zařízení a podmínkách, při kterých měří) stávají limitem dalšího poklesu SEM. Ustálila se názorná veličina, která dlouhodobý trend SEM popisuje a lze ji snadno graficky znázornit (viz obr. 3). Udává ji většina výrobců a nazývá se Allanova variance. Zjednodušeně můžeme říci, že pro kratší časové úseky klesá Allanova variance s odmocninou počtu pozorování a je přibližně rovna SEM. Pro delší úseky (většinou hodiny a více) začíná opět vzrůstat, neboť dlouhodobý drift (který má většinou hned několik příčin současně) začne mít větší vliv na výslednou hodnotu než má nyní náhodný šum minimalizovaný vysokým počtem již proběhlých měření.

LITERATURA

1. Sauke T. B., Becker J. F., Loewenstein M., Gutierrez T. D., Brattan C. G.: *Spectroscopy* 9, 34 (1994).
2. Berryman E. M., Marshall J. D., Rahn T., Cook S. P., Litvak M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2355 (2011).
3. Wahl E. H., Fidric B., Rella C. W., Koulikov S., Kharlamov B., Tan S., Kachanov A. A., Richman B. A., Crosson E. R., Paldus B. A., Kalaskar S., Bowling D. R.: *Isot. Environ. Health Stud.* 42, 21 (2006).
4. Becker J. F., Sauke T. B., Loewenstein M.: *Appl. Opt.* 31, 1921 (1992).
5. Midwood A. J., Millard P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 232 (2011).
6. van Geldern R., Nowak M., Zimmer M., Szizybalski A., Myrtilinen A., Barth J. A. C., Jost H.-J.: *Anal. Chem.* 86, 12191 (2014).
7. Roller Ch.B.: *Dissertation*. Rice University, Houston, Texas 2005.
8. Civiš S., Cihelka J., Matulková I.: *Opto-Electron. Rev.* 18, 408 (2010).
9. Esler M. B., Griffith D. W. T., Wilson S. R., Steele L. P.: *Anal. Chem.* 72, 216 (2000).
10. Mohn J., Zeeman M. J., Werner R. A., Eugster W., Emmenegger L.: *Isot. Environ. Health Stud.* 44, 241 (2008).
11. Civiš S., Ferus M., Kubát P., Zúkalová M., Kavan L.: *J. Phys. Chem. C* 115, 11156 (2011).
12. Griffith D. W. T., Deutscher N. M., Caldow C., Kettlewell G., Riggenbach M., Hammer S.: *Atmos. Meas. Tech.* 5, 2481 (2012).
13. Nelson D. D., McManus J. B., Herndon S. C., Zahniser M. S., Tuzson B., Emmenegger L.: *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* 90, 301, (2008).
14. Horká V., Civiš S., Xu L.-H., Lees R.: *Analyst* 130, 1148 (2005).
15. Bowling D. R., Sargent S. D., Tanner B. D., Ehleringer J. R.: 2003.: *Agric. For. Meteorol.* 118, 1 (2003).
16. Gulluk T., Wagner H. E., Slemr F.: *Rev. Sci. Instrum.* 68, 230 (1997).
17. Schupp M., Bergamaschi P., Harris G. W., Crutzen



Obr. 3. Ukázka grafu Allanovy variance pro narůstající čas integrace (průměrovací čas) izotopového signálu. Pro kratší časy integrace variance klesá s odmocninou času (podobně jako střední chyba průměru náhodné veličiny). Pro delší časy se pokles zpomalí a nakonec začne narůstat vlivem dlouhodobého driftu systému

- P. J.: *Chemosphere* 26, 13 (1993).
18. Bergamaschi P., Schupp M., Harris G. W.: *Appl. Opt.* 33, 7704 (1994).
 19. Wang C., Srivastava N., Jones B. A., Reese R. B.: *Appl. Phys. B: Lasers Opt.* 92, 259 (2008).
 20. Zare R. N., Kuramoto D. S., Haase C., Tan S. M., Crosson E. R., Saad N. M. R.: *PNAS* 106, 10928 (2009).
 21. Jackson R. B., Down A., Phillips N. G., Ackley R. C., Cook Ch. W., Plata D. L., Zhao K.: *Environ. Sci. Technol.* 48, 2051 (2014).
 22. Sandstrom L. G., Lundqvist S. H., Pettersson A. B., Shumate M. S.: *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 5, 1040 (1999).
 23. Stepanov E. V.: *Quantum Electron.* 32, 981 (2002).
 24. Engel S., Lease H. M., McDowell N. G., Corbett A. H., Wolf B. O.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 1281 (2009).
 25. Crosson E. R., Ricci K. N., Richman B. A., Chilese F. C., Owano T. G., Provencal R. A., Todd M. W., Glasser J., Kachanov A. A., Paldus B. A., Spence T. G., Zare R. N.: *Anal. Chem.* 74, 2003 (2002).
 26. Griffis T. J., Baker J. M., Sargent S. D., Tanner B. D., Zhang J.: *Agric. For. Meteorol.* 124, 15 (2004).
 27. Griffis T. J., Baker J. M., Zhang J.: *Agric. For. Meteorol.* 132, 1 (2005).
 28. Zhang J., Griffis T. J., Baker J. M.: *Plant, Cell Environ.* 29, 483 (2006).
 29. Griffis T. J., Zhang J., Baker J. M., Kljun N., Billmark K.: *Bound.-Layer Meteor.* 123, 295 (2007).
 30. Bowling D. R., Schaeffer S. M., Miller J. B., Vaughn B. H., White J. W. C.: *Atmos. Chem. Phys.* 8, 5263 (2008).
 31. Griffis T. J., Lee X., Baker J. M., Sargent S. D., King J. Y.: *Agric. For. Meteorol.* 135, 44 (2005b).
 32. Tcherkez G., Nogues S., Bleton J., Cornic G., Badeck F., Ghashghaie J.: *Plant Physiol.* 131, 237 (2003).
 33. Badeck F. W., Tcherkez G., Nogues S., Piel C., Ghashghaie J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1381 (2005).
 34. Barbour M. M., McDowell N. G., Tcherkez G., Bickford C. P., Hanson D. T.: *Plant, Cell Environ.* 30, 469 (2007).
 35. Barbour M. M., Hunt J. E., Kodama N., Laubach J., McSeveny T. M., Rogers G.N.D., Tcherkez G., Wingate L.: *New Phytol.* 190, 990 (2011).
 36. Barbour M. M., Farquhar G. D., Hanson D. T., Bickford C. P., Powers H., McDowell N. G.: *Plant, Cell Environ.* 30, 456 (2007).
 37. Wingate L., Ogée J., Burlett R., Bosc A.: *Glob. Change Biol.* 16, 3048 (2010).
 38. Bahn M., Schmitt M., Siegwolf R., Richter A., Brüggemann N.: *New Phytol.* 182, 451 (2009).
 39. Powers H. H., Hunt J. E., Hanson D. T., McDowell N. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 243 (2010).
 40. Epron D., Dannoura M., Maillard P., Fresneau C., Plain C., Berveiller D., Gerant D., Chipeaux C., Bosc A., Ngao J., Damesin C., Loustau D.: *New Phytol.* 190, 181 (2011).
 41. Bickford C. P., McDowell N. G., Erhardt E. B., Hanson D. T.: *Plant, Cell Environ.* 32, 796 (2009).
 42. Douthe C., Dreyer E., Epron D., Warren C.: *J. Exp. Bot.* 62, 5335 (2011).
 43. Evans J. R., Tazoe Y., Von Caemmerer S., Estavillo G. M.: *Plant, Cell Environ.* 34, 580 (2011).
 44. Douthe C., Dreyer E., Brendel O., Warren C.: *Funct. Plant Biol.* 38, 434 (2012).
 45. Pengelly J. J. L., Sirault X. R. R., Tazoe Y., Evans J. R., Furbank R. T., von Caemmerer S.: *J. Exp. Bot.* 61, 4109 (2010).
 46. Kerstel E. R. T., Gagliardi G., Gianfrani L., Meijer H. A. J., van Trigt R., Ramaker R.: *Spectrochim. Acta, Part A* 58, 2389 (2002).
 47. Lee X. H., Sargent S., Smith R., Tanner B.: *J. Atmos. Oceanic Technol.* 22, 555 (2005).
 48. Wen X. F., Zhang S. C., Sun X. M., Wang J. L., Yu G. R.: *J. Geogr. Sci.* 21, 401 (2011).
 49. Day M. P., Zhang B. and Martin G. J.: *J. Sci. Food Agric.* 67, 113 (1995).
 50. Lee X., Welp L. R., Kim K., Griffis T. J., Billmark K. A., Baker J. M.: *Plant, Cell Environ.* 31, 1214 (2008a).
 51. Griffis T. J., Lee X., Baker J. M., Billmark K., Schultz N., Erickson M., Zhang X., Fassbinder J., Xiao W., Hu N.: *J. Geophys. Res.* 116, 1 (2011).
 52. Le Barbu T., Vinogradov I., Durry G., Korabiev O., Chassefiere E., Bertaux J. L.: *Adv. Space Res.* 38, 718 (2006).

J. Kubásek (Choceň): Optical Spectroscopy for Analysis of the Ratio of Stable Isotopes. Competition or Alternative for Conventional Mass Spectroscopy of Stable Isotopes (IRMS)?

The present brief review deals with optical methods for the stable isotope analysis of biogenic elements. It consists of both the methodical and application parts and focuses on the state-of-art methods and devices and their suitability for particular analyses. Practical and financial points of view are included and compared to the current method of choice, Isotope-Ratio Mass Spectrometry (IRMS). Application effort is focused on biochemistry, physiology, ecology and micrometeorology. Critical cornerstones of the method implementation and author's personal experience are involved as well.