

Степанов Е.В.

**Диодная лазерная
спектроскопия и
анализ
молекул-биомаркеров**



МОСКВА
ФИЗМАТЛИТ ®

УДК 543.4
ББК 28.071
С 79



Издание осуществлено при поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований по проекту 08-02-07020

Степанов Е. В. **Диодная лазерная спектроскопия и анализ молекул-биомаркеров.** — М.: ФИЗМАТЛИТ, 2009. — 416 с. — ISBN 978-5-9221-1152-2.

Монография посвящена применению методов диодной лазерной спектроскопии для решения задач биомедицинской диагностики, основанной на высокочувствительном спектральном анализе газообразных молекул-биомаркеров.

Проведен анализ основных спектральных и аналитических характеристик перестраиваемых диодных лазеров и объектов исследования — диагностически значимых газообразных молекул, продуцируемых в организме. Представлены результаты лабораторных и клинических исследований, иллюстрирующие возможности и перспективы применения развиваемого аналитического подхода в неинвазивной диагностике различных заболеваний. Описаны методы и системы спектрального анализа, предназначенные для неинвазивных исследований механизмов образования, транспорта и выделения образуемых в живых организмах биомаркеров.

Для широкого круга специалистов в области лазерной спектроскопии и ее применений в исследованиях молекул, высокочувствительного газового анализа и биомедицинской диагностике, а также студентов и аспирантов соответствующих специальностей.

Научное издание

СТЕПАНОВ Евгений Валерьевич

**ДИОДНАЯ ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ
И АНАЛИЗ МОЛЕКУЛ-БИОМАРКЕРОВ**

Редактор *О.В. Салецкая*

Редактор-организатор *Т.Ю. Давидовская*

Оригинал-макет: *Е.В. Чернина*

Оформление переплета: *И.В. Степанова, Н.В. Гришина*

Подписано в печать 25.08.09. Формат 60×90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 26. Уч.-изд. л. 27,3. Тираж 300 экз. Заказ №

Издательская фирма «Физико-математическая литература»
МАИК «Наука/Интерпериодика»
117997, Москва, ул. Профсоюзная, 90
E-mail: fizmat@maik.ru, fmlsale@maik.ru;
<http://www.fml.ru>

Отпечатано в ГУП
«ИПК Чувашия», 428019
г. Чебоксары, пр-т И.Яковлева, 13

ISBN 978-5-9221-1152-2

© ФИЗМАТЛИТ, 2009

© Е. В. Степанов, 2009

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	8
Глава 1. Методы высокочувствительного газового анализа молекул-биомаркеров в исследованиях выдыхаемого воздуха	11
1.1. Высокочувствительный анализ состава выдыхаемого воздуха как инструментальная задача	12
1.2. Газообразные молекулы-биомаркеры в медицинской диагностике	15
1.3. Методы исследований состава выдыхаемого воздуха	18
1.3.1. Газовая хроматография	18
1.3.2. Масс-спектрометрия с газохроматографическим разделением	19
1.3.3. Электрохимические датчики	21
1.3.4. Хемолуминесцентные сенсоры	22
1.3.5. Методы спектрального анализа	23
1.4. Аналитические возможности диодной лазерной спектроскопии	27
1.4.1. Перестраиваемые диодные лазеры	27
1.4.2. Спектральный диапазон, перекрываемый ПДЛ	29
1.4.3. Перестройка частоты излучения ПДЛ (механизмы и параметры)	30
1.4.4. Спектральные свойства и шумы ПДЛ	31
1.4.5. Особенности используемых конструкций и технологий ПДЛ	34
1.4.6. ПДЛ как инструмент для спектральных исследований	36
1.4.7. Диодная лазерная спектроскопия как аналитический метод	38
Глава 2. Методы и системы спектрального анализа на основе перестраиваемых диодных лазеров	52
2.1. Методы управления параметрами излучения перестраиваемых диодных лазеров при импульсно-периодической накачке	53
2.1.1. Характеристики ДГС ПДЛ на основе соединений A_4B_6	55
2.1.2. Методы предварительной селекции ПДЛ	56

2.1.3. Управление параметрами излучения	65
2.2. Чувствительность детектирования резонансного поглощения с помощью перестраиваемых диодных лазеров при импульсно-периодической накачке	74
2.2.1. Основные типы шумов и помех при регистрации спектров пропускания с помощью ПДЛ	75
2.2.2. Методы увеличения чувствительности и точности регистрации лазерных спектров	79
2.3. Автоматизированная система управления для диодной лазерной спектроскопии и спектрального анализа	88
2.3.1. Требования к системе. Основные и вспомогательные блоки. Оценка необходимых параметров	89
2.3.2. Реализация системы	93
2.3.3. Структура программного обеспечения управляющего персонального компьютера	100
2.3.4. Основные характеристики ИК-спектрометра на основе ПДЛ	105
2.3.5. Программно-аппаратный комплекс нового поколения	106
Глава 3. Спектральные свойства газообразных биомаркеров и выбор оптимальной аналитической линии при интерференции спектров детектируемых газов.	112
3.1. Особенности концентрационных измерений с помощью ПДЛ	114
3.1.1. Редкие изолированные линии	116
3.1.2. Плотный спектр с разрешенной КВ-структурой	118
3.1.3. Интерференция полос анализируемого и мешающих газов	119
3.2. Специфика спектрального анализа выдыхаемого воздуха	120
3.3. Метод выбора оптимальной аналитической линии	123
3.3.1. Исчезновение экстремумов аналитической линии	123
3.3.2. ИЭАЛ при прямой регистрации спектра поглощения	124
3.3.3. ИЭАЛ для производных спектра поглощения	126
3.3.4. Соотношение между концентрациями при ИЭАЛ	127
3.3.5. Влияние снижения суммарного давления анализируемой газовой смеси	129
3.4. Применение метода для выбора аналитических линий	130
3.4.1. Выбор оптимальной спектральной области для регистрации NO	130
3.4.2. Выбор оптимальной спектральной области для регистрации NH ₃	134
3.5. Интерференция полос молекулярного поглощения в ближнем ИК-диапазоне	136

Глава 4. Лазерный мониторинг эндогенной окиси углерода в выдыхаемом воздухе человека и животных	146
4.1. Биологическая роль окиси углерода	149
4.1.1. Физические и химические свойства окиси углерода	149
4.1.2. Механизмы образования эндогенной окиси углерода в организме	151
4.1.3. Физиологическая роль окиси углерода	153
4.1.4. Механизмы утилизации окиси углерода в организме	154
4.1.5. Механизмы транспорта окиси углерода	155
4.1.6. Аналитические методы для исследований эндогенного СО в выдыхаемом воздухе	170
4.1.7. Экспериментальные исследования выделения эндогенного СО в норме и при патологиях	171
4.2. Основные закономерности и модель выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом	174
4.2.1. Общие закономерности выделения эндогенного СО	174
4.2.2. Перенос СО из крови в выдыхаемый воздух	174
4.2.3. Перенос СО из клеточных и тканевых систем буферирования на гемоглобин	179
4.2.4. Динамика выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом	185
4.2.5. Оценка динамических параметров	192
4.3. Методы и приборы для исследований закономерностей выделения эндогенной окиси углерода с выдыхаемым воздухом	200
4.3.1. Объекты и методы исследования	200
4.3.2. Лазерный анализатор окиси углерода в выдыхаемом воздухе	203
4.3.3. Анализаторы СО ₂ и О ₂	207
4.3.4. Измерение скорости потока газа в выдыхаемом воздухе с помощью ультразвукового датчика потока	207
4.3.5. Определение параметров кровотока	208
4.3.6. Средства автоматизации измерений	209
4.3.7. Методы отбора и анализа проб выдыхаемого воздуха	209
4.3.8. Экспериментальные аналитические комплексы	214
4.3.9. Методы биохимического анализа лактата и кислотно-основного состояния крови	216
4.4. Экспериментальные результаты мониторинга СО в выдыхаемом воздухе человека и лабораторных животных	217
4.4.1. Естественные вариации скорости выделения эндогенного СО	218
4.4.2. Влияние изменений состава вдыхаемого воздуха	221
4.4.3. Динамика содержания СО в выдыхаемом воздухе при проведении различных нагрузочных тестов	234

4.4.4. Применение лазерной методики детектирования эндогенного СО для клинической диагностики заболеваний.	247
4.5. Лазерный анализ СО в исследованиях по физиологии растений. . .	251
Глава 5. Высокочувствительный анализ других газообразных биомаркеров с помощью перестраиваемых диодных лазеров . . .	255
5.1. Лазерный мониторинг эндогенного NO в выдыхаемом воздухе . . .	256
5.1.1. Актуальность и проблематика детектирования NO, продуцируемого в организме	256
5.1.2. Спектральные свойства NO, требуемые аналитические параметры и выбор аналитического диапазона	257
5.1.3. Лазерный анализатор NO в выдыхаемом воздухе	259
5.1.4. Экспериментальные данные по применению анализа NO для биомедицинской диагностики	261
5.2. Лазерный мониторинг эндогенного NH ₃ в выдыхаемом воздухе. . .	267
5.2.1. NH ₃ как биологически активная молекула и биомаркер	267
5.2.2. Спектроскопия молекулы NH ₃ в среднем ИК-диапазоне. . . .	268
5.2.3. Лазерный анализатор NH ₃ в выдыхаемом воздухе	268
5.2.4. Детектирование изотопической модификации аммиака ¹⁵ NH ₃ 270	
5.2.5. Экспериментальные результаты по регистрации NH ₃ в выдыхаемом воздухе.	273
5.3. Лазерный мониторинг эндогенного CH ₄ в выдыхаемом воздухе . . .	273
5.3.1. CH ₄ как биологически активная молекула и биомаркер	273
5.3.2. Спектроскопия молекулы CH ₄ в среднем ИК-диапазоне	274
5.3.3. Лазерный анализатор CH ₄ в выдыхаемом воздухе.	274
5.3.4. Экспериментальные результаты по регистрации CH ₄ в выдыхаемом воздухе.	276
5.4. Диагностика относительного содержания орто- и параводы.	277
5.4.1. Спектроскопия орто- и параводы в ИК-диапазоне	278
5.4.2. Лазерный анализатор относительного содержания молекул орто- и параводы.	282
5.4.3. Анализ динамики спин-селективных процессов в молекулах H ₂ O методами ДЛС.	285
Глава 6. Методы многокомпонентного лазерного газоанализа для биомедицинской диагностики	290
6.1. Использование случайного близкого расположения аналитических линий детектируемых молекул	290
6.1.1. Одновременное детектирование СО и СО ₂ для исследований кислород-транспортных свойств гемоглобина при изменяющемся уровне СО ₂ в крови	291

6.1.2. Одновременное детектирование CO и N ₂ O для исследований зависимости газотранспортных свойств легочной мембраны от интенсивности кровотока	292
6.1.3. Одновременное детектирование NO и CO ₂ для контроля маневра дыхания при исследованиях воспалительных процессов в дистальных отделах легких	293
6.1.4. Одновременное детектирование NH ₃ и CO ₂ для исследований общего обмена и основных метаболических циклов.	294
6.2. Специальные методы накачки ПДЛ	295
6.2.1. Одновременный анализ NH ₃ , CO ₂ и C ₂ H ₄	295
6.2.2. Одновременное детектирование CO, CO ₂ и N ₂ O	297
6.2.3. Измерение ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂ вблизи 2 мкм.	297
6.3. Многоканальные оптические схемы	298
6.3.1. Особенности мультиволновых оптических схем с использованием нескольких ПДЛ	299
6.3.2. Интеграция ПДЛ с элементами ИК волоконной оптики	301
Глава 7. Высокочувствительный анализ относительного изотопического содержания с помощью перестраиваемых диодных лазеров	303
7.1. Методы и средства анализа изотопического отношения углерода ¹³ C/ ¹² C в выдыхаемой двуокиси углерода	303
7.1.1. Специфика определения ИОУ в CO ₂ выдыхаемого воздуха	305
7.1.2. Измерение отношения ¹³ CO ₂ / ¹² CO ₂ методами ДЛС	307
7.1.3. Источники погрешностей при определении ИОУ с помощью ДЛС	323
7.1.4. Моделирование систематических погрешностей	327
7.1.5. Экспериментальные результаты	337
7.2. Клинические применения лазерного анализа относительного содержания ¹² CO ₂ и ¹³ CO ₂ в выдыхаемом воздухе в диагностике и терапии <i>H.pylori</i> -ассоциированных заболеваний	349
7.2.1. Этиологическая роль <i>Helicobacter pylori</i> и методы ее обнаружения	352
7.2.2. ¹³ C-уреазный дыхательный тест	353
7.2.3. Применение лазерного ¹³ C-УДТ в клинической практике	358
7.3. Другие области применения лазерной изотопической диагностики	377
Список литературы	381

Введение

Одной из интенсивно развивающихся в настоящее время областей применения лазерной физики и техники является биомедицина. Использование лазерного излучения открывает новые возможности как для диагностики процессов, происходящих в живых организмах, так и для контролируемого и точно дозируемого терапевтического или хирургического воздействия.

Новое диагностическое направление использования лазеров в биомедицине, которому посвящена эта монография, связано с высокочувствительным спектральным анализом газообразных молекул-биомаркеров в процессах газообмена живых организмов с окружающей средой, в частности при респираторном дыхании. Фундаментальная основа этого диагностического подхода состоит в том, что, например, в воздухе, выдыхаемом человеком, помимо N_2 , O_2 , CO_2 и H_2O , содержатся следы еще более 600 летучих соединений, образуемых в организме. Продукция каждого такого вещества обусловлена течением определенных биохимических реакций в организме, что позволяет использовать некоторые молекулы, имеющие высокую специфичность образования, в качестве биомаркеров. Привлекательной стороной диагностики, основанной на анализе химического состава выдыхаемого воздуха, является возможность исследовать процессы, происходящие в живом организме без вторжения в него, т. е. неинвазивно, и в реальном времени. Однако для ее практической реализации требуются высокая чувствительность и селективность обнаружения изучаемых молекулярных соединений, доступные далеко не всем современным аналитическим методам.

Детектирование следов газообразных молекул в выдыхаемом воздухе относится к числу наиболее сложных задач газового анализа, что связано с очень низкими концентрациями исследуемых веществ ($0,1 \text{ млрд}^{-1} - 1 \text{ млн}^{-1}$) и, напротив, высоким содержанием газов, мешающих анализу (CO_2 и H_2O). Используемые для этих целей инструментальные подходы должны обеспечивать возможность прямого анализа в режиме реального времени без предварительного концентрирования или обогащения проб выдыхаемого воздуха и в то же время обладать высокой селективностью измерений относительно доминирующих в анализируемой пробе газовых компонент. Используемый для анализа физический принцип должен быть универсален и применим для детектирования различных молекулярных соединений.

Одним из наиболее мощных современных методов газового анализа является диодная лазерная спектроскопия (ДЛС), уникальные диагностические возможности которой обусловлены редким сочетанием

спектральных свойств перестраиваемых диодных лазеров (ПДЛ), обладающих одновременно узкой линией и широкодиапазонной перестройкой частоты генерации. Низкий уровень амплитудных и частотных шумов ПДЛ позволяет регистрировать резонансное молекулярное поглощение с чувствительностью к изменению оптической плотности вплоть до 10^{-7} и спектральным разрешением $\sim 3 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}$. Электронное управление параметрами излучения ПДЛ дает возможность достаточно легко автоматизировать системы на основе таких лазеров и обеспечивает высокие скорости управления частотой их излучения.

ПДЛ применимы для исследований большого числа молекул, спектры поглощения которых попадают в область генерации лазеров данного типа, простирающуюся от 0,6 до 40 мкм. Доступность такого широкого спектрального диапазона позволяет для конкретной исследуемой молекулы и аналитической задачи подобрать область, оптимальную для регистрации, с учетом микрокон прозрачности атмосферы и перекрытия со спектрами поглощения других мешающих газов. В настоящее время наибольшая концентрационная чувствительность ($\sim 0,01 \text{ млрд}^{-1}$) реализована в среднем ИК-диапазоне, где располагаются основные колебательно-вращательные (КВ) полосы поглощения молекул. Такие аналитические характеристики достигаются при достаточно простых функциональных схемах приборов на основе ПДЛ. Отметим также возможность одновременной регистрации нескольких газов с помощью одного лазера и интеграции нескольких ПДЛ в многокомпонентные системы, в том числе с применением волоконной оптики.

Перечисленные аналитические возможности ПДЛ достаточно четко определяют область их перспективного использования для биомедицинской диагностики, основанной на анализе молекул-биомаркеров. Это, во-первых, детектирование следов достаточно легких молекул типа CO, CO₂, NO, NO₂, N₂O, NH₃, H₂O, H₂O₂, C₂H₄, C₂H₆, CH₂O, CH₄, CH₃OH, C₂H₅OH, CS₂, H₂S, C₅H₁₂, C₂H₆, CH₂OHS и других в диапазоне концентраций от 1 млн⁻¹ до 0,1 млрд⁻¹. Во-вторых, высокоточная регистрация относительного содержания изотопических модификаций молекул-метаболитов, обогащенных более редкими изотопами (D, ¹³C, ¹⁸O, ¹⁵N и ³⁵S), а также спиновых изомеров, таких, например, как молекулы орто- и параводы или этилена. В-третьих, долговременный мониторинг таких соединений, включая многокомпонентный, а также исследование их динамики в режиме реального времени, которые могут осуществляться без накопления или обогащения анализируемой газовой смеси.

Актуальность развития этой новой области применения методов лазерной физики обусловлена перспективностью их использования как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях в биофизике, биохимии, биологии, экологии, медицине, физиологии человека, животных и растений. При исследовании состава выдыхаемого воздуха они позволяют расширить круг изучаемых молекулярных объектов, продвинуться в область более низких концентраций детектируемых веществ,

ускорить и упростить проведение анализа. На их основе могут быть разработаны новые подходы к неинвазивной диагностике с использованием измерений в реальном времени, долговременного непрерывного мониторинга и массовых скрининговых обследований. В практической медицине перспективна разработка новых методов корреляционной диагностики, радиационно-безопасной диагностики с применением стабильных изотопов, сопровождения и оптимизации терапевтических воздействий различного характера, диагностики экстремальных физиологических состояний. Данный подход может быть также использован в фармакологии, для оценки воздействия загрязнений окружающей среды и в эпидемиологических исследованиях.

Данная монография базируется на экспериментальных результатах и разработках автора и является итогом его работы в течение последних полутора десятилетий в Отделе экологических и медицинских проблем Института общей физики им. А. М. Прохорова РАН. Хотелось бы специально отметить роль д. ф.-м. н. Валерия Александровича Миляева, заведующего упомянутого выше отдела, в становлении и развитии этого научного направления и поблагодарить его за всестороннюю поддержку этой работы и неформальный к ней интерес. Значительную помощь и поддержку автору в его исследованиях и экспериментальной деятельности оказали сотрудники ИОФ РАН к. т. н. П. В. Зырянов, д. т. н. А. И. Дьяченко, д. ф.-м. н. В. Н. Бинги и к. ф.-м. н. Л. Р. Янгузова. Большая часть медико-биологических исследований была проведена в сотрудничестве с коллегами из научных медицинских организаций, таких как ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Клиника пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии им. В. Х. Василенко Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова и Институт пульмонологии МЗ РФ. Автор чрезвычайно признателен сотрудникам этих организаций: коллегам-медикам к. б. н. Ю. А. Шулагину, к. т. н. Е. В. Бабарскову, к. м. н. Е. И. Никитиной, к. м. н. А. В. Лапшину и д. м. н. Е. К. Баранской за творческое участие и сотрудничество в исследованиях. Особую благодарность за всестороннюю поддержку данной работы хотелось бы выразить академикам РАМН В. Т. Ивашкину и А. Г. Чучалину, а также профессору Б. Н. Павлову.

Автор особенно признателен сотрудникам Физического института им. П. Н. Лебедева Ю. Г. Селиванову и Е. Г. Чижевскому, которые в течение многих лет специально разрабатывали и предоставляли перестраиваемые диодные лазеры для данной работы. Без их участия развитие данного диагностического направления было бы вряд ли возможно.

Исследования, результаты которых легли в основу монографии, были частично проверены в рамках проектов РФФИ 05-08-50288, 07-02-01402, 08-02-01185, а также Программ Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» и «Поддержка инноваций и разработок».

Глава 1

МЕТОДЫ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ГАЗОВОГО АНАЛИЗА МОЛЕКУЛ-БИОМАРКЕРОВ В ИССЛЕДОВАНИЯХ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА

Одним из важнейших факторов существования живых организмов является их газообмен с окружающей средой. Его основу составляют поглощение кислорода и выделение паров воды и углекислого газа [1, 2], происходящие при внешнем дыхании и обусловленные в основном энергозатратами организма. Эти процессы настолько интенсивны, что изменения концентрации O_2 и CO_2 вследствие дыхания достигают нескольких процентов ($>3\%$) от суммарного состава выдыхаемого воздуха [2]. Еще одной составляющей газообмена является множество других достаточно легких газообразных соединений, которые в гораздо меньших количествах образуются в организме и потому присутствуют, например, в выдыхаемом воздухе в виде следов (относительные концентрации менее 1 млн^{-1}). Они продуцируются в результате разнообразных процессов, связанных с регулированием скоростей биохимических реакций, передачей информации, обновлением или изменением структур организма и течением патологических процессов [1], и, чтобы избежать накопления, должны быть выведены из организма. Данные о выделении таких веществ могли бы быть ценными для изучения и диагностики биохимических и физиологических процессов, происходящих в организме как в норме, так и при патологиях, т.е. при заболеваниях. Некоторые из таких молекул, обладающие наибольшей специфичностью образования в организме, можно использовать в качестве естественных газообразных биомаркеров [3–5].

Представления о выделении живыми организмами некоторых газообразных веществ на уровне микроконцентраций активно развиваются в настоящее время благодаря прогрессу в создании высокочувствительных и высокоточных аналитических методов. При исследовании газообмена человека наиболее актуален анализ следов газообразных веществ в выдыхаемом воздухе, так как анатомическое строение легких специально приспособлено для высокоэффективного обмена газами между воздухом и кровью. В частности, общая площадь альвеолярной мембраны легких взрослого человека может существенно превышать 100 м^2 [6]. В настоящее время известно, что нормальный выдох человека является сложной смесью около 600 летучих соединений [7, 8]. Спектр веществ, следы которых обнаруживаются в выдыхаемом воздухе, простирается от двухатомных молекул типа водорода (H_2) [9, 10], окислов углерода (CO) [11, 12] и азота (NO) [13, 14] до многоатомных алифатических и ароматических углеводородов [5, 8].

В этой главе проблема высокочувствительного анализа состава выдыхаемого воздуха рассматривается как аналитическая задача. Обсуждаются ее особенности и требуемые для ее решения инструментальные характеристики, анализируются возможности наиболее чувствительных современных методов исследования газовых сред, включая методы диодной лазерной спектроскопии. Приводятся данные о взаимосвязи ряда газообразных соединений с некоторыми патологическими процессами в организме человека и возможности их использования в качестве биомаркеров для диагностики заболеваний.

1.1. Высокочувствительный анализ состава выдыхаемого воздуха как инструментальная задача

Изучение газообмена биологических объектов и, в частности, анализ состава выдыхаемого воздуха являются обширной областью исследований, где могут найти применение различные инструментальные подходы с достаточно широким спектром аналитических характеристик. Это обусловлено целым рядом факторов, среди которых:

- разнообразие веществ, которые могут служить биомаркерами;
- различие их физико-химических свойств;
- различие диапазона их концентраций в выдыхаемом воздухе;
- разнообразие механизмов их продукции, транспорта и выделения;
- разнообразие исследуемых биологических объектов, физиологических состояний, заболеваний, патологических и фармакологических процессов;
- широкий спектр возможных воздействий токсического и терапевтического характера на организм.

Используемые в конкретных исследованиях методы подбираются таким образом, чтобы их аналитические возможности были адекватны решаемой диагностической задаче и ее специфике. Можно выделить несколько методических подходов, часто используемых при анализе состава выдыхаемого воздуха:

- использование накопления и конденсации выдыхаемого воздуха, позволяющих повысить концентрационную чувствительность анализа [12, 15–17];
- регистрация процессов в реальном времени и проведение длительного и непрерывного мониторинга [18];
- минимизация объема анализируемой пробы воздуха для локализации области продукции исследуемого соединения [19, 20];
- отбор и анализ многократных проб для определения динамики выделения исследуемого соединения [10, 21, 22];
- проведение относительных измерений [23];
- одновременный анализ нескольких соединений или всего спектра выделяемых веществ [8, 25, 26].

Требуемые аналитические характеристики

Возможности методов, применяемых для аналитических исследований, обусловлены совокупностью целого ряда характеристик. Наиболее важными из них являются концентрационная чувствительность, точность и скорость анализа, которые в основном определяются используемым физическим принципом детектирования вещества. Кроме того, существенными являются требуемый для анализа объем газовой пробы, селективность анализа, необходимость предварительного обогащения и разделения, специфика отбора пробы, необходимость разрушения объекта в процессе анализа.

Идеальный инструментальный метод, предназначенный для высокочувствительного анализа состава выдыхаемого воздуха, должен обладать следующим набором характеристик.

Концентрационная чувствительность. В зависимости от исследуемого молекулярного объекта концентрационная чувствительность должна составлять от 10 млрд^{-1} до $0,1 \text{ млн}^{-1}$ [5, 7, 12]. При анализе относительных изменений изотопного состава выдыхаемого воздуха требуемый уровень чувствительности составляет $\sim 0,05\%$ [22, 27].

Точность детектирования. При регистрации как отдельных соединений, так и их относительного содержания достаточно точности определения измеряемых величин порядка 3–5%, что обусловлено сравнительно большой амплитудой «физиологических шумов», связанных с неравномерностью дыхания и кровотока [10, 22]. При одновременном детектировании целого спектра соединений и использовании процедур концентрирования приемлемая меньшая точность, до 10–30% [25].

Быстродействие. Анализ состава выдыхаемого воздуха в реальном масштабе времени требует быстродействия на уровне 0,1 с [19, 20]. Анализ с усреднением по нескольким выдохам — около 5–10 с. Для анализа с накоплением пробы выдоха и концентрированием допустима скорость измерения ~ 10 –30 мин [5, 15, 17]. Необходимая скорость анализа изотопного содержания выдыхаемого воздуха диктуется технологией проведения массовых измерений и составляет 1–3 минуты на одну исследуемую пробу [27].

Селективность детектирования. Поскольку выдыхаемый воздух представляет собой сложную газовую смесь, для анализа его микро состава требуется высокая селективность детектирования исследуемых веществ. Применяемый метод должен быть прежде всего нечувствителен к азоту и кислороду, концентрации которых составляют десятки процентов. Кроме того, важна селективность относительно паров воды и CO_2 , концентрация которых в выдохе доходит до 3–6% [6], что на 6–8 порядков выше содержания искомым веществ. При сопоставимом содержании исследуемых соединений должна быть обеспечена селективность их детектирования при близких физико-химических свойствах (молекулярных массах, спектральных особенностях, диффузионных характеристиках и т. п.).

Требуемый объем газовой пробы. Для контроля изменений концентрации исследуемого вещества в реальном времени, который применяется, как правило, при исследовании так называемых патернов дыхания [18–20, 28], необходимый для анализа объем пробы выдыхаемого воздуха должен составлять не более 10 мл. Анализ с усреднением по нескольким выдохам возможен с использованием одного-двух литров газовой смеси. Для исследований изотопного состава выдыхаемого воздуха, как правило, достаточно от 20 до 500 мл [27]. При использовании накопления газовой пробы с целью последующего концентрирования или химического превращения может понадобиться от 10 до 100 л газовой смеси [12, 15, 17].

Отбор проб выдыхаемого воздуха. Как видно, для исследований микросостава выдыхаемого воздуха наиболее желательным сочетанием аналитических параметров является такое, при котором реализуются концентрационная чувствительность на уровне 10 трлн^{-1} и быстродействие $\sim 0,1 \text{ с}$ при объеме газовой пробы $\sim 10 \text{ мл}$. Кроме того, в рамках единого метода должны регистрироваться различные газообразные молекулы с близкой к 100% селективностью. В настоящее время ни один из существующих подходов не может обеспечить совокупности таких аналитических характеристик, поэтому на практике для повышения, например, чувствительности и/или селективности жертвуют менее значимыми: как правило, быстродействием и/или точностью. Этот путь реализуется при применении различных методов отбора пробы выдыхаемого воздуха и пробоподготовки. Для этого используются:

- концентрирование на различных сорбентах, в частности, криогенное, в целях преодоления проблем недостаточной чувствительности [5, 15–17];
- фильтрация физическая или химическая с применением специальных сорбентов для устранения из смеси воды и двуокиси углерода [12, 29];
- хроматографическое разделение с целью повышения селективности детектирования [27];
- циркулирование по замкнутому контуру для накопления эффекта при использовании неразрушающих методов анализа [5, 30].

Однако помимо потери временного разрешения манипуляции такого рода могут приводить к искажению не только количественных данных, но и качественной картины спектра соединений в выдыхаемый воздух. Например, при использовании обогащения возможны неконтролируемые изменения относительных концентраций веществ [16, 17, 29] или взаимодействие исследуемых веществ.

Еще одна возможность — использование различных типов дыхания (так называемых маневров), например, задержки дыхания, гипервентиляции, дыхания против сопротивления [20, 28, 31]. Использование этих методов, направленных, как правило, либо на накопление выделяемых газов, либо на разделение фракций выдыхаемого за один выдох воздуха, также может оказывать неконтролируемое влияние

на получаемый результат вследствие изменений как респираторной динамики, так и биохимических параметров организма [28].

1.2. Газообразные молекулы-биомаркеры в медицинской диагностике

Активное развитие диагностического направления, связанного с анализом микросостава выдыхаемого воздуха, началось в восьмидесятих годах [10, 22], что обусловлено как углублением представлений о протекающих в живом организме молекулярных процессах, так и интенсивным развитием инструментальных методов высокочувствительного газового анализа. В настоящее время накоплен достаточно большой объем данных, свидетельствующих о возможности использования газообразных биомаркеров в биомедицинской диагностике. В таблице 1.1, базирующейся на публикациях последних лет, приведены молекулярные газообразные соединения, для которых было отмечено изменение их содержания в выдыхаемом воздухе человека при некоторых патологиях или стрессорных нагрузках, что является основанием для более детального исследования таких процессов. Каждое из перечисленных соединений характеризуется своей особенной ролью в жизни организма, специфическими механизмами образования и фармакокинетикой, т. е. способами и путями выведения или ассимиляции. Несмотря на интенсивные исследования, эти закономерности для большинства биологически активных газообразных молекул еще недостаточно хорошо изучены. Например, лишь в самые последние годы было обнаружено, что молекулы CO и NO, которые до недавнего времени рассматривались исключительно как экзогенные соединения с токсическим действием, образуются в самом организме и играют важнейшую роль в его жизнедеятельности [12, 32, 33]. Сложность исследования эндогенно-образуемых газообразных молекул связана как с необычным разнообразием биохимических и физиологических процессов, действующих в живом организме, так и со множеством факторов, определяющих специфику их образования и выделения. Тем не менее, в общем виде цепочка процессов, в которых участвует любое газообразное вещество, выделяемое с выдыхаемым воздухом, может быть представлена следующим образом:

- образование молекул в ходе какой-либо биохимической реакции или сложного метаболического процесса;
- их диффузия в кровеносную систему;
- возможное промежуточное накопление (буферирование);
- возможный захват молекул системами утилизации, ассимиляции или естественная химическая трансформация;
- их транспорт в легкие;
- трансмембранная диффузия в воздушное пространство легких;

Таблица 1.1. Газообразные молекулы в выдыхаемом человеком воздухе и их диагностическая значимость

Молекула	Заболевание или стрессорная нагрузка	Источники
Водород (H ₂)	Расстройства пищеварения младенцев Расстройства желудочно-кишечного тракта Мальабсорбция углеводов	[34] [9, 10, 35] [35, 36]
Оксись углерода (CO)	Анемии (гемолитическая, сидеробластическая, серповидно-клеточная) Карбоксигемоглобинемия при остром и хроническом облучении Долговременное пребывание при повышенном содержании O ₂ Гипербилирубинемия новорожденных Оксидативный стресс Гематомы, гемоглобинурия, приклампсия, инфекции, талассемия Инфекция дыхательных путей Астма	[11, 37, 38] [12] [39] [37, 40] [41] [37] [42] [43]
Оксись азота (NO)	Хроническая обструктивная болезнь легких Астма Гипертензия Бронхоэктазис Инфекция верхних дыхательных путей Ринит Воспалительные процессы в желудке (гастрит) в том числе инфекция <i>Helicobacter pylori</i> Рак органов пищеварения Тяжелый сепсис Хронические инфекционные воспалительные процессы (гастрит, гепатит, колит)	[44, 45] [46–48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56]
Аммиак (NH ₃)	Острая и хроническая лучевая болезнь Метаболизм моноаминов в легких Почечная недостаточность: при нефритах, гипертонической болезни, атеросклерозе почечных артерий, токсикозе и нефропатии беременных, токсических поражениях почек Недостаточность печени при желтухах, гепатитах, циррозе печени, токсическом гепатите Рак легкого	[12] [57] [5] [5] [5]
Метан (CH ₄)	Расстройства желудочно-кишечного тракта Мальабсорбция углеводов	[9, 10] [10, 34]
Перекись водорода (H ₂ O ₂)	Ослабленная дыхательная функция легких Острая и хроническая лучевая болезнь Астма	[58] [12] [4, 58]

Таблица 1.1. (продолжение)

Молекула	Заболевание или стрессорная нагрузка	Источники
CS ₂ и пентан	Фактор риска при заболеваниях коронарных артерий Шизофрения	[59] [60]
Этилен (C ₂ H ₄)	Оксидативный стресс, перекисное окисление липидов Воспалительные процессы (хроническая астма, воспаление внутренних органов) Острый инфаркт миокарда Разрушения, вызываемые свободными радикалами	[26, 29, 58] [61] [62] [27, 63]
Этан (C ₂ H ₆)	Маркер витамина Е у детей Е-убихинольный статус при перекисном окислении липидов Курящие и некурящие Маркер разрушений, вызываемых свободными радикалами	[64] [65] [66] [27, 63]
Этан (C ₂ H ₆) и пентан	Перекисное окисление липидов при пересадке печени Маркер перекисного окисления липидов	[67] [68]
Фенол (H ₂ CO)	Фармакокинетика и метаболизм фенола	[69]
Бутан и пентан	Маркеры перекисного окисления липидов, заболевания печени, (цирроз печени, первичный желчный цирроз, хронический активный гепатит, жировая дистрофия)	[70]
Метанол Этанол Ацетальдегид	Заболевания центральной нервной системы Сахарный диабет Алкоголизм	[71] [5] [5, 72]
Ацетон	Функция поджелудочной железы при остром деструктивном панкреатите и диетическом разбалансе Тяжелая сердечная недостаточность Рак легкого	[73] [74] [75, 76]
Пентан и его производные	Рак груди Острый инфаркт миокарда Отторжение трансплантированного сердца Ревматоидный артрит Обострение бронхиальной астмы	[77] [62] [78] [79] [61]
Изотопические модификации CO ₂	Инфицирование бактерией Прохождение пищи через желудочно-кишечный тракт Дисфункция печени в т.ч. цирроз Избыточный рост бактерий Дисфункции поджелудочной железы Усвоение лактозы Мальабсорбция Метаболизм желчи Метаболизм глюкозы	[80–83] [22, 84–87] [21, 88–92] [22, 91] [94–96] [97] [98] [99] [100]

Таблица 1.1. (окончание)

Молекула	Заболевание или стрессорная нагрузка	Источники
Алканы (гексан, метилпентан и производные бензола, стирин, производные гептана, декан, О-толуедин, гепатенал, ноан, анилин и продукты перекисного окисления липидов	Рак легкого	[25, 26, 76, 101, 102]

— диффузия молекул и перемешивание с вдыхаемым воздухом в альвеолярном пространстве легких;

— выделение молекул с выдыхаемым воздухом.

В идеале для каждого исследуемого эндогенно-образуемого соединения требуется специальное рассмотрение всей последовательности перечисленных выше процессов и изучение их влияния на содержание исследуемого вещества в выдыхаемом воздухе. На основе такого анализа может быть составлено представление о диагностической значимости того или иного молекулярного соединения и возможных способах его использования в качестве биомаркера.

1.3. Методы исследований состава выдыхаемого воздуха

Определение микросостава выдыхаемого воздуха относится к числу наиболее сложных аналитических задач. В связи с этим лишь немногие физико-химические методы определения следовых количеств газообразных веществ нашли применение в этой области исследований. Среди них газовая хроматография (ГХ), масс-спектрометрия, совмещенная с газохроматографическим разделением (МС-ГХ), электрохимические сенсоры (ЭХ), УФ-хемолюминесценция (УФХЛ) и ИК-спектроскопия (ИКС). Последняя включает фурье-спектроскопию (ФС), оптоакустическую спектроскопию (ОАС) и лазерную спектроскопию (ЛС). Ниже дана краткая характеристика этих методов с точки зрения использования в анализе микросостава выдыхаемого воздуха и приведены примеры таких применений.

1.3.1. Газовая хроматография

ГХ является наиболее часто применяемым методом анализа следовых количеств веществ, особенно органических, в сложных газовых смесях [103]. Класс регистрируемых с помощью ГХ веществ зависит от типа применяемых детекторов. В качестве последних используются плазменно-ионизационные, плазменно-фотометрические, фотоионизационные детекторы и детекторы с захватом электронов. Чувствительность детектирования методами ГХ составляет $1-10^3$ млрд⁻¹, в то же время селективность большинства методов

ГХ низка [103]. Ограничивает сферу применения ГХ в анализе содержания выдыхаемого воздуха необходимость предварительного концентрирования и/или уменьшение объема анализируемой пробы. В ряде случаев требуется предварительное превращение анализируемых веществ в их производные, что существенно снижает точность измерений. Время анализа составляет 20–30 с, не считая времени, необходимого на пробоподготовку. Затруднителен непрерывный высокочувствительный мониторинг состава исследуемой газовой смеси в реальном времени.

О применении ГХ в анализе содержания выдыхаемого воздуха для диагностики ряда заболеваний, включая рак легкого и алкоголизм, сообщалось в работе [72]. В работе [63] обсуждается применение ГХ для исследования процессов перекисного окисления липидов в организме человека посредством мониторинга выдыхаемых летучих углеводородов, таких как этилен (C_2H_4), этан (C_2H_6) и пентан (C_5H_{12}), являющихся маркерами разрушений, вызываемых свободными радикалами. Для достижения требуемой чувствительности детектирование этих гидрокарбонатов осуществлялось с применением предварительного концентрирования проб выдыхаемого воздуха на твердых сорбентах. Отмечается, что выбор подходящего сорбента чрезвычайно сложен, а проницаемость материалов стенок, абсорбция и загрязнения атмосферы могут сделать результаты анализа неподдающимися интерпретации [29]. С помощью ГХ достаточно эффективно удается детектировать выделение с выдыхаемым воздухом ацетона, что применялось для исследований секреторной функции поджелудочной железы при остром деструктивном панкреатите [73]. Повышенные концентрации ацетона зарегистрированы при диетическом разбалансе [74] и сильной сердечной недостаточности [75], а комбинация ацетона, метилкетона и *n*-пропанола — при раке легких [76]. Использование техники ГХ для анализа состава выдыхаемого воздуха ограничено, как правило, исследовательскими лабораториями из-за сложности и громоздкости оборудования и необходимости квалифицированного обслуживания.

1.3.2. Масс-спектрометрия с газохроматографическим разделением

МС-ГХ является наиболее часто применяемым в настоящее время методом качественного и количественного анализа химического состава выдыхаемого воздуха. Газохроматографическое разделение пробы выдыхаемого воздуха применяется, чтобы отделить следы исследуемых веществ от мешающих N_2 , O_2 , CO_2 и H_2O , а масс-спектрометр выполняет роль высокочувствительного и высокоточного детектора [103]. Предварительное разделение существенно поднимает точность и селективность детектирования. Обработка регистрируемых масс-спектров производится с помощью компьютеров, что позволяет провести идентификацию сотен веществ, входящих в такую сложную газовую смесь как выдыхаемый воздух. Кроме того, с помощью ЭВМ

осуществляется количественный анализ регистрируемых соединений, контроль за разрешающей способностью хроматографической системы, учитываются «ложные ионы» и возможная интерференция МС-пиков. При использовании специальных методов пробоподготовки достижима чувствительность на уровне 1 млрд^{-1} .

Анализ состава выдыхаемого воздуха на основе МС-ГХ как метод диагностики различных заболеваний активно развивается М. Филлипсом [7, 8, 15–17, 26, 59, 60]. Этот метод применяется для исследований достаточно сложных летучих органических веществ, которые могут оказаться маркерами онкологических заболеваний [25, 26, 76, 101, 102]. Пробы выдыхаемого воздуха собираются с помощью специальной ионной ловушки с сорбентом [16], концентрируются с помощью двухстадийного криоконцентратора, сепарируются с помощью газовой хроматографии, а далее анализируются, оцифровываются и идентифицируются с помощью масс-спектрометра по методике, описанной в [17]. С помощью данной методики было установлено, что, в сравнении с выдыхаемым воздухом здоровых людей [8], при раке легкого наблюдается повышенное содержание алканов, таких как гексан, метилпентан и производные бензола [17, 76], стирин, производных гептана, декана, производных циклопентана, октана, бутадие-циклогексана, гепатенала, нонана [26]. Кроме того, при раке легкого были обнаружены о-толуедин, анилин и продукты перекисного окисления липидов [101, 102]. Патофизиология образования этих веществ пока неизвестна. Частично объяснение может быть связано с увеличением активности свободных радикалов кислорода в раковых клетках. С помощью МС-ГХ обнаружено, что дисульфид серы (CS_2) является фактором риска при заболеваниях коронарных артерий [59] и более интенсивно выделяется вместе с пентаном у пациентов при шизофрении [7].

Высокие концентрации пентана в выдыхаемом воздухе методами МС-ГХ были обнаружены при раке груди [77], остром инфаркте миокарда [62], отторжении трансплантированного сердца [78], ревматоидном артрите [79] и острой бронхиальной астме [61]. Пентан, бутан и этан, регистрируемые в выдохе, используются как маркеры перекисного окисления липидов [68] под действием свободных радикалов при пересадке печени [67] и ее заболеваниях типа цирроза печени, первичного желчного цирроза, хронического активного гепатита, жировой дистрофии [70].

В [13] было описано первое экспериментальное обнаружение NO в выдохе малых животных с использованием МС-ГХ и хемилюминесценции, а в [104] приводится подтверждение наличия NO в выдыхаемом воздухе человека, основанное также на применении МС-ГХ-метода.

Анализаторы на основе МС-ГХ наиболее интенсивно применяются в настоящее время для определения изотопического отношения углерода (ИОУ) в выдыхаемой двууглекислоте [23, 24, 27]. Дыхательные тесты, основанные на этом принципе, становятся все более распростра-

ненными для неинвазивной диагностики в гастроэнтерологии. С их помощью диагностируется ряд заболеваний, которые перечислены выше в таблице.

К достоинствам и преимуществам МС-ГХ следует отнести следующие:

— За одно измерение получается наиболее полный спектр соединений (несколько сотен), входящих в состав выдыхаемого воздуха. Этот метод не имеет альтернативы с точки зрения чувствительности и селективности при исследовании летучих органических соединений средней массы в диапазоне от 70 до 300 а.е.м. Однако следует принимать во внимание возможность ошибочной интерпретации и идентификации спектров за счет интерференции МС-пиков.

— Высокая точность измерений при специально настроенной селективной регистрации. Например, точность измерения изотопического отношения $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ в выдыхаемом воздухе составляет 0,01–0,03 % [27].

— Для анализа достаточен небольшой объем выдыхаемого воздуха порядка 10 мл.

Ограничения применимости МС-ГХ связаны со следующими факторами.

Для высокочувствительной регистрации на уровне 1 млрд^{-1} требуется криогенное концентрирование, которое приводит к искажению состава пробы.

При масс-спектрометрическом анализе могут возникнуть проблемы, связанные с селективностью детектирования и идентификацией спектров и обусловленные совпадением величин M/z для ряда легких газообразных соединений и их изотопических модификаций. В частности, могут интерферировать такие группы соединений как $\{^{12}\text{C}^{16}\text{O}, ^{14}\text{N}_2, ^{12}\text{C}_2\text{H}_4\}$, $\{^{14}\text{N}^{16}\text{O}, ^{12}\text{C}^{18}\text{O}, ^{15}\text{N}_2, \text{H}_2^{12}\text{C}^{16}\text{O}, ^{12}\text{C}_2\text{H}_6\}$ и $\{^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2, ^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}, ^{12}\text{C}_2\text{H}_4^{16}\text{O}\}$.

Время анализа с помощью МС-ГХ достаточно велико, например, измерение отношения $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ занимает около 2 мин, т.е. использование данной методики для мониторинга или регистрации процессов в реальном времени затруднительно.

МС-ГХ считается достаточно сложным, громоздким и дорогостоящим прибором (требуются особо чистые газы-носители для ГХ разделения, высокий вакуум для МС, тонкая технология при работе с криоконцентраторами и сорбентами).

1.3.3. Электрохимические датчики

ЭХ-сенсоры применяются в основном для регистрации неорганических газообразных соединений типа O_2 , CO , CO_2 , NO , NO_2 , H_2S , SO_2 , HCN , HCl , Cl_2 и, как правило, имеют диапазон рабочих концентраций $0,1 - 100 \text{ млн}^{-1}$ при быстроедействии 10 – 15 с [103, 105]. Требуемый объем анализируемой пробы достаточно мал – 10 – 20 мл. ЭХ-анализаторы являются относительно простыми и надежными при-

борами, идеально подходящими для исследований, требующих компактности и автономного питания. Поскольку чувствительность этих датчиков не очень велика, то для диагностики состава выдыхаемого воздуха они применяются лишь в некоторых специальных случаях. Один из примеров — применение для детектирования выделения эндогенного СО с выдыхаемым воздухом [19, 106, 107] с целью контроля продукции этого газа, обусловленной катаболизмом гем-содержащих структур. Серьезным недостатком применения ЭХ-сенсоров является низкая селективность анализа, усугубляющаяся для сложных газовых смесей и в присутствии воды. Для улучшения селективности анализа используются фильтры и ловушки, которые, однако, могут неконтролируемым образом пропускать некоторые газы. Например, при детектировании СО в выдыхаемом воздухе методами ЭХ возникает проблема эндогенного водорода [34, 106], который продуцируется в нижнем отделе кишечника за счет бактериальной ферментации углеводов и присутствует в выдохе младенцев [34, 106] и взрослых людей [36]. Применение фильтров и ловушек чревато проблемами их засорения и снижения эффективности, а также возможностью неконтролируемого изменения спектра фильтруемых соединений со временем.

1.3.4. Хемолюминесцентные сенсоры

УФХЛ в основном применяется для детектирования газообразных соединений типа NH_3 , NO_x , SO_2 , H_2S , O_3 . При химическом взаимодействии, как правило, окислении этих соединений газом-реагентом, происходит эмиссия фотонов в УФ-диапазоне, которые регистрируются с помощью фотоумножителя. Чувствительность детектирования перечисленных выше газов данным методом находится на уровне 1 млрд^{-1} при быстродействии менее 1 с. Для анализа требуется очень небольшое количество анализируемой газовой смеси, порядка 1–10 мл.

В анализе микрокомпонентов выдыхаемого воздуха УФХЛ применяется для детектирования эндогенно продуцируемой окиси азота (NO) [13, 20, 44, 108, 109]. При диагностике выдыхаемого воздуха существенно, что этот метод не чувствителен к CO_2 , СО, H_2O , этанолу и органонитратам. Кроме того, за счет высокого быстродействия и малого количества необходимой для регистрации газовой смеси удастся регистрировать динамику выделения NO в масштабе реального времени, в частности, в течение отдельного выдоха (при дыхательном маневре с использованием жизненной емкости легких и выдоха в течение 20–30 с против сопротивления). Это устраняет необходимость использования резервуара для сбора газа, что обычно приводит к потере реакционноспособного NO, и дает большую чувствительность и воспроизводимость.

Недостатки и ограничения хемолюминесцентных сенсоров. При измерении NO в качестве газа-реагента используется O_3 . Среди летучих соединений в выдыхаемом воздухе могут оказаться такие, которые также могут вступать в реакцию с озоном, сопровождающуюся эмисси-

ей фотонов, и, таким образом, влиять на регистрируемый сигнал. Для одновременной регистрации любых других компонентов выдыхаемого газа, в том числе и CO_2 , требуется применение других физических принципов детектирования.

1.3.5. Методы спектрального анализа

1.3.5.1. Дисперсионная ИК-спектрометрия. Известно несколько работ, в которых методы дисперсионной ИКС использовались для исследований газообмена биологических объектов, включая выдыхаемый воздух человека. В работе [110] использовался спектрофотометр ближнего ИК-диапазона для мониторинга экзогенной и эндогенной СО в выдохе человека. Отмечается, однако, что анализатор громоздок и чувствителен к воде и CO_2 и требует значительных объемов выдыхаемого воздуха.

В работе [111] описывается теория, конструкция и применение спектрометра, основанного на детектировании второй производной сигнала поглощения и предназначенного для определения NH_3 в биологических растворах [112] и сравнения парциального давления аммиака в альвеолярном воздухе и артериальной крови [113].

В работах [114, 115] инфракрасная спектрометрия использовалась для определения изотопного отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в двуокиси и моноокиси углерода. Однако в них не была достигнута требуемая для медицинской диагностики чувствительность анализа. Отметим также применение принципов гетеродинной радиометрии с использованием некогерентного источника излучения для определения $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ [116].

Основные характеристики детектирования газов с использованием дисперсионной ИКС: чувствительность на уровне $0,1\text{--}1\text{ млн}^{-1}$, требуемый объем пробы $1\text{--}2\text{ л}$, быстродействие $5\text{--}10\text{ мин}$. Недостатки: низкие селективность и чувствительность, быстродействие не позволяет проводить регистрацию в режиме реального времени, требуется криогенное обогащение исследуемой газовой пробы.

1.3.5.2. Фурье-спектрометрия. Благодаря достаточно высокому спектральному разрешению ФС ($\sim 0,01\text{ см}^{-1}$ для распространенных моделей спектрометров и $\sim 0,001\text{ см}^{-1}$ для уникальных образцов), этот метод также может применяться для высокочувствительного спектрального газоанализа. Один из вариантов применения ФС для анализа состава выдыхаемого воздуха представлен в работе [117].

Для ФС характерна возможность регистрации в течение одного измерения очень широкой спектральной области, которая фактически ограничена лишь областью спектральной чувствительности используемого фотоприемника (например, $1\text{--}14\text{ мкм}$ для HgCdTe). Таким образом, можно одновременно регистрировать спектры поглощения многих веществ, в том числе, и не имеющих разрешенной КВ-структуры. Благодаря высокому разрешению и широкому спектральному диапазону достижима хорошая селективность детектирования.

Недостатками ФС как аналитического метода являются невысокая чувствительность к поглощению (относительная чувствительность 10^{-2} – 10^{-3}) т.е. его концентрационная чувствительность не лучше $0,1 \text{ млн}^{-1}$ даже при использовании многоходовых кювет (МХК). Для регистрации спектра поглощения с требуемым разрешением даже в узком спектральном интервале требуется от 5 до 10 мин, что существенно ограничивает скорость анализа. Расширение спектрального интервала детектирования требует дополнительного времени на компьютерную обработку сигналов, которое может достигать до нескольких часов. Преимущества ФС могут быть реализованы при использовании накопления и предварительного концентрирования пробы выдыхаемого воздуха.

1.3.5.3. Спектроскопия с использованием лазерных источников.

Данный подход основан на совпадении частот генерационных переходов, как правило, газовых лазеров того или иного типа с частотой линии поглощения исследуемого газа. Известен ряд работ, связанных с применением такого подхода для изучения газообмена человека и биологических объектов. В работах [30, 118] описан фотодефлекционный метод детектирования малых концентраций газов, в частности, NH_3 , основанный на фототермическом отклонении лазерного пучка. Накачка исследуемой среды производится CO_2 -лазером. В результате селективного поглощения излучения аммиаком, вызывающего нагрев и изменения коэффициента преломления среды, происходит отклонение пробного луча He-Ne-лазера. Концентрационная чувствительность такой схемы составляет $\sim 0,5 \text{ мкг/м}^3$, а быстродействие — $\sim 15 \text{ с}$ при использовании двух лазерных линий, позволяющих снизить влияние поглощения CO_2 и H_2O . Достоинством метода является малый объем исследуемой газовой смеси.

О применении волноводного $^{13}\text{CO}_2$ -лазера для измерения NH_3 в выдыхаемом воздухе сообщалось в [119], а в [120] описаны результаты одного из первых исследований по лазерному изотопному анализу углерода в CO_2 .

Газовый CO_2 -лазер был использован для реализации опто-гальванической схемы детектирования изотопного отношения углерода $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в двууглекислоте выдыхаемого воздуха [121]. В этой схеме излучение двух газовых лазеров на основе $^{13}\text{CO}_2$ и $^{12}\text{CO}_2$ пропусклось через газоразрядную кювету с исследуемой газовой смесью. Ток разряда оказался чувствительным к величине резонансного поглощения средой. Точность определения величины изотопного отношения $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ составляет около 0,05 %. Анализатор, базирующийся на этом принципе, был применен в клинических исследованиях для диагностики гастроэнтерологических заболеваний с помощью дыхательных тестов, основанных на использовании стабильного изотопа углерода ^{13}C .

Основные недостатки подхода: ограниченный выбор пригодных для анализа линий поглощения исследуемых веществ, обуславливающий

снижение точности, чувствительности и селективности детектирования слабого резонансного поглощения, проблемы нулевого поглощения и плохо контролируемых интерференционных помех, сложность реализации многокомпонентного анализа.

Многообещающими аналитическими возможностями обладают квантово-каскадные лазеры (ККЛ), возможность создания которых была экспериментально продемонстрирована в 1994 г. [122, 123]. Они представляют собой многослойные гетероструктуры из полупроводниковых материалов типа InGaAs-InAlAs, в которых генерация происходит за счет каскада внутризонных переходов. Длина волны генерации определяется толщиной полупроводниковых слоев гетероструктуры ККЛ и поэтому может задаваться при изготовлении лазера.

ККЛ по своим характеристикам очень близки к ПДЛ. Для спектральных и аналитических применений важно, что лазеры данного типа могут генерировать в диапазоне длин волн от 3,5 до 24 мкм, в одномодовом режиме обладают узкой линией генерации с шириной 1–3 МГц, могут перестраиваться в широком спектральном диапазоне за счет температуры и тока накачки, мощность их генерации может составлять десятки мВт. При этом существенно, что разработчики надеются в скором будущем реализовать эти характеристики при комнатных температурах.

Недавно появились первые сообщения о применении ККЛ для целей газового анализа, включая анализ биологически активных газообразных молекул, таких как CO, NO и CH₄ [124–128].

В работе [127] описана система на основе охлаждаемого до температуры жидкого азота ККЛ, предназначенная для детектирования NO в выдыхаемом воздухе. Для анализа использовалась линия R(12,5) NO, расположенная вблизи 1918,7 см⁻¹. Детектирование оптического сигнала производилось с помощью быстродействующего приемника на основе CdHgTe, работающего при комнатной температуре. При использовании оптического пути в многоходовой кювете длиной 100 м, понижения суммарного давления воздуха до 50 торр, числа накоплений сигнала 10⁴ (время анализа 200 с) была реализована концентрационная чувствительность ~ 2,6 млрд⁻¹. Чувствительность к оптической плотности была на уровне 10⁻⁴, что на два-три порядка хуже уровня, достижимого в принципе с помощью ПДЛ.

По-видимому, основным фактором, ограничивающим чувствительность детектирования резонансного поглощения с помощью ККЛ в реальных условиях, будут интерференционные помехи, как и в случае ПДЛ. Поэтому преимущество данной технологии может быть реализовано, когда ККЛ будут работать в непрерывном режиме при температурах, близких к комнатным.

Необходимо также упомянуть о возможности и перспективности использования для спектрального анализа состава выдыхаемого воздуха параметрических генераторов света (см. например, [129, 130]), а также

схем, основанных на сочетании лазерных источников с многоходовыми резонансными ячейками, обладающими свойствами многократного усиления поглощения исследуемой среды (методов так называемых ringdown spectroscopy и enhanced-cell spectroscopy) [131–133]. Эти принципы были недавно применены для высокочувствительного детектирования следов аммиака [134], окиси азота [135] и формальдегида [136] в окружающем воздухе, а также этана в выдыхаемом воздухе [136–139]. Кроме того, их эффективность была продемонстрирована при использовании в изотопическом анализе атмосферного метана [140, 141].

1.3.5.4. Оптоакустическая спектроскопия (ОАС). ОАС является одним из наиболее чувствительных методов газового анализа, особенно при использовании лазерных источников излучения и внутрирезонаторного оптоакустического датчика поглощения [142, 143]. Это обусловлено тем, что она относится к категории так называемых «нулевых методов», в которых регистрируемый сигнал пропорционален концентрации исследуемого вещества. ОАС обладает преимуществами при детектировании тех газообразных веществ, которые имеют линии поглощения, хорошо совпадающие с линиями генерации газовых лазеров, например, CO_2 - или CO -лазеров. В целом, оптоакустическое детектирование обладает низким пределом обнаружения, хорошим временным разрешением и достаточной селективностью, чтобы отличать разные газы. В оптимальных условиях предел детектирования может составлять $0,01$ млрд⁻¹ при быстром действии в несколько секунд [88, 144]. Кроме того, не требуется аккумулировать и обогащать исследуемое вещество, так как достаточно небольшого объема газовой пробы (около 10 мл); исследуемый газ можно прокачивать через ОА-ячейку непрерывно.

Применение методов лазерной ОАС к исследованиям газообмена различных биологических объектов интенсивно развивается в лаборатории Ф. Харрена [144–146], Нидерланды. В ней был разработан анализатор этилена (C_2H_4) с пределом обнаружения в очищенном от других углеводородов атмосферном воздухе на уровне $0,006$ млрд⁻¹ [147, 148]. Длина внутрирезонаторной акустической ячейки составляла 100 мм, а мощность излучения внутри резонатора используемого CO_2 -лазера – 100 Вт. Для детектирования использовалась линия поглощения C_2H_4 из полосы ν_7 , имеющая коэффициент поглощения $30,4$ атм⁻¹·см⁻¹ и совпадающая с линией 10P(14) CO_2 -лазера на частоте $949,479$ см⁻¹.

К сожалению, ОАС с использованием газовых лазеров не обладает селективностью, особенно к CO_2 и воде, кроме того, возможно неконтролируемое влияние других многочисленных молекул, содержащихся в выдохе [149]. Это требует применения специальных систем пробоподготовки и очистки выдыхаемого воздуха, в том числе, криогенных [149]. В частности, в работе [29] для детектирования этилена в выдыхаемом воздухе использовалась специальная система отбора пробы выдоха. Водяной конденсат, который может помешать измерениям,

осаждался с помощью гранул CaCl_2 . Двуокись углерода, содержащаяся в выдыхаемом воздухе на уровне 5%, удалялась с помощью скруберов. Для устранения других летучих веществ, например, ацетона, который может интерферировать спектроскопически, использовалась криогенная ловушка.

Недостатки метода лазерной ОАС обусловлены теми же причинами, что и для рассмотренных выше методов, использующих излучение газовых лазеров (ограниченный выбор аналитических линий, интерференция со спектрами мешающих газов). Кроме того, оптоакустический сигнал сильно зависит от концентрации паров воды, которая может менять колебательную релаксацию в исследуемой молекуле, и кислорода, действующего как буфер вращательной энергии [145]. Например, предел детектирования с помощью ЛОАС метана в сухом воздухе составляет ~ 10 млрд⁻¹, для чистого азота — 1 млрд⁻¹, а в присутствии воды он поднимается до ~ 100 млрд⁻¹. В то же время расчет, проведенный с учетом только шумов приемного тракта, коэффициента поглощения и лазерной мощности, дает предел детектирования $\sim 0,1$ млрд⁻¹ [145]. Кроме того, системы ОАС, основанные на использовании CO_2 -лазеров, как правило, громоздки и тяжелы в эксплуатации.

Следует также отметить возможность применения нелазерных ОАС-методов детектирования для определения изотопного отношения углерода в выдыхаемой CO_2 . В частности в работах [88, 150–152] описываются две версии недисперсионного ИК-спектрометра для определения $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ в выдыхаемом воздухе, основанных на применении ОАС и газовых фильтров, и первые результаты их клинических испытаний. Данные приборы позволяют определять вариации величины $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ с точностью 0,07–0,1 %.

1.4. Аналитические возможности диодной лазерной спектроскопии

Диодная лазерная спектроскопия принадлежит к числу наиболее чувствительных и в то же время высокоселективных аналитических методов, используемых для детектирования достаточно легких газообразных молекул активных в ИК-поглощении [153–155]. Этим обусловлена актуальность ее применений для высокочувствительного спектрального анализа состава выдыхаемого воздуха. Ниже представлен краткий анализ современных методов, технологий и достижений в области ДЛС, позволяющий оценить перспективность и возможные области ее использования в биомедицинской диагностике, основанной на детектировании следов газообразных молекул-биомаркеров в выдыхаемом воздухе.

1.4.1. Перестраиваемые диодные лазеры

Перестраиваемые диодные лазеры представляют собой особую группу инжекционных полупроводниковых лазеров, химический состав,

структура и конструктивные особенности которых ориентированы на получение лазерного излучения, обладающего высокой степенью монохроматичности ($\Delta\nu/\nu \approx 10^{-7}$), но в то же время перестраиваемого управляемым образом по частоте в достаточно широком спектральном диапазоне [153, 154, 156].

Принцип действия ПДЛ, как и любого инжекционного лазера, основан на непосредственном преобразовании электрической энергии в оптическое излучение (см. например, [157]). Инжекция носителей в область p - n -перехода, происходящая при пропускании через полупроводниковый лазерный кристалл тока смещения в прямом направлении, приводит к инверсии носителей (электронов и/или дырок) в активной области и стимуляции вынужденных квантовых переходов. Лазерная генерация происходит при токах, превосходящих некоторое пороговое значение I_{th} , при котором потери излучения за счет поглощения в резонаторе и частичного выхода во внешнюю среду компенсируются его стимулированным усилением. Оптический резонатор полупроводникового лазера образуется, как правило, за счет естественных граней полупроводникового кристалла, получаемых при скальвании, так называемый резонатор Фабри–Перо. В ряде случаев используются внешние резонаторы или специально формируемые резонаторы с распределенной обратной связью (РОС). При рабочих токах вблизи пороговых значений выходная мощность растет практически линейно с током. Расходимость лазерного луча дифракционная и обусловлена малым размером излучающей активной области. Она составляет 15 – 20° в плоскости p - n -перехода и 30 – 40° в поперечном направлении (для диффузионных ПДЛ).

Благодаря простоте преобразования электрической энергии в оптическую полупроводниковые лазеры обладают уникальной совокупностью свойств, обеспечивающих привлекательность их применения для решения разнообразных задач. Среди них высокая стабильность мощности и частоты оптического излучения, высокие качества перестройки длины волны генерации, высокое быстродействие, возможность полностью электронного управления параметрами излучения, компактность и экономичность.

Применения полупроводниковых лазеров весьма разнообразны. В настоящее время они широко используются в спектроскопии и газоанализе, для передачи информации в волоконных оптических системах связи, записи и считывания цифровой информации на оптических дисках, в качестве источников накачки твердотельных лазеров, для лазерной терапии в медицине и других областях. Каждая из областей применения диктует свои специфические требования к характеристикам лазеров, которые, как правило, затруднительно реализовать в одном устройстве. При использовании полупроводниковых лазеров в качестве источников перестраиваемого монохроматического излучения для целей спектрального газового анализа доминирующими оказываются

спектральные характеристики. Принципиальными и определяющими являются следующие из них:

- работа в спектральном диапазоне, где реализуются наилучшие условия детектирования исследуемых газообразных соединений (с учетом разнообразия молекулярных соединений — это практически весь ИК-диапазон);

- достаточная мощность излучения (от долей до единиц мВт) и низкие шумы мощности, обеспечивающие низкие пороги обнаружения газообразных веществ;

- одномодовый состав излучения в используемом диапазоне рабочих токов и температур, гарантирующий однозначную регистрацию спектров пропускания исследуемой газовой среды;

- узкая ширина линии генерации, позволяющая получать полное разрешение спектральных особенностей исследуемых объектов, в частности, линий поглощения газов как при атмосферном, так и при низких давлениях, и являющаяся залогом высокой чувствительности и селективности детектирования;

- качество и скорость перестройки оптической частоты, обеспечивающие воспроизводимое сканирование в выбранном аналитическом спектральном диапазоне;

- стабильность и воспроизводимость параметров излучения.

С технической и эксплуатационной точек зрения существенными являются также рабочие температуры, продолжительность безотказного функционирования и надежность лазерных образцов, их габариты и стоимость. Этими же параметрами в немалой степени определяется конкурентоспособность аналитических методов, разрабатываемых на основе ПДЛ, при сравнении с альтернативными подходами, основанными на других физико-химических принципах.

1.4.2. Спектральный диапазон, перекрываемый ПДЛ

Семейству инжекционных полупроводниковых лазеров принадлежит лидерство среди лазеров различных типов по ширине спектральной области, где возможна их генерация. Она распространяется от ближнего УФ- до дальнего ИК-диапазона. Такой широкий спектральный диапазон перекрывается за счет вариации химического состава применяемых полупроводниковых соединений и структуры лазерного кристалла.

В дальнем и среднем ИК-диапазонах работают лазеры на основе узкозонных полупроводниковых соединений типа A_4B_6 [153, 156, 158]. С помощью тройных и четверных соединений твердых растворов солей свинца, таких как $PbSnTe$, $PbSSe$ и $PbEuSeTe$, может быть перекрыт диапазон от 2 до 40 мкм.

Лазеры на соединениях типа A_3B_5 генерируют в красном и ближнем ИК-диапазонах от 0,6 до 3,5 мкм [157, 159]. Соединения типа $AlGaAs$, $AlGaInP$ и $GaInP$ перекрывают диапазон 0,6–0,9 мкм. $InGaAs$

и InGaAsP работают в диапазонах 0,9–1,1 мкм и 1,2–1,7 мкм. Область 1,7–3,5 мкм перекрывается соединениями типа GaInAsSb и InAsSbP.

Несколько лет назад появились сообщения о разработке инжекционных полупроводниковых лазеров синего и ближнего УФ-диапазонов [160]. Они основаны на использовании соединений GaN [161].

С точки зрения применимости для целей высокочувствительного газового анализа важно отметить, что лазеры типа A_4B_6 генерируют в спектральном диапазоне, где расположены в основном колебательно-вращательные полосы фундаментального поглощения большинства газообразных молекулярных соединений. В ближнем ИК-диапазоне, перекрываемом лазерами на основе соединений типа A_3B_5 , располагаются полосы, образуемые составными колебаниями и обертонами основных переходов. Вероятности таких переходов и, как следствие, интенсивности образуемых ими линий поглощения на 2–4 порядка ниже, чем для основных переходов в среднем ИК-диапазоне [162, 163]. Поэтому, несмотря на преимущества лазеров на основе соединений типа A_3B_5 , обусловленные более высокой степенью развития технологии их изготовления и возможностью работы при комнатных температурах, для получения наибольшей концентрационной чувствительности анализа с помощью ПДЛ предпочтительным является использование среднего ИК-диапазона. Привлекательным для целей газоанализа представляется УФ-диапазон, где располагаются очень интенсивные электронные полосы поглощения молекул и разработаны высокочувствительные методы регистрации оптических сигналов. Однако этот спектральный диапазон пока не освоен как с точки зрения молекулярной спектроскопии высокого разрешения, так и с точки зрения технологии изготовления ПДЛ.

1.4.3. Перестройка частоты излучения ПДЛ (механизмы и параметры)

Возможность достаточно легкой широкодиапазонной перестройки частоты генерации отдельного образца (в диапазоне $200\text{--}400\text{ см}^{-1}$, в зависимости от материала и конструкции) является еще одним важным достоинством ПДЛ. Такая перестройка реализуется за счет изменения температуры лазерного кристалла, поскольку от температуры зависит ширина запрещенной зоны полупроводника, которой определяется частота лазерной генерации [154]. Типичные значения скорости перестройки ширины запрещенной зоны при изменении температуры в зависимости от материала составляют $1,5\text{--}4\text{ см}^{-1}/\text{К}$. Кроме того, от температуры зависят длина лазерного резонатора и показатель преломления лазерной среды, которыми определяются значения частот собственных мод резонатора. Типичные значения скорости перестройки частот резонаторных мод составляют $0,4\text{--}1,0\text{ см}^{-1}/\text{К}$. Поскольку температурная зависимость ширины запрещенной зоны и частот собственных мод резонатора различны, перестройка частоты ПДЛ имеет кусочно-непрерывный характер, т. е. зоны непрерывной перестройки

частоты перемежаются с зонами «молчания». Типичная длина непрерывной перестройки одной моды составляет $1\text{--}4\text{ см}^{-1}$, приблизительно той же величины достигают и зоны молчания. В некоторых случаях наблюдаются более протяженные моды, до $6\text{--}12\text{ см}^{-1}$. Частые скачки мод могут быть устранены при использовании специальных структур с РОС или распределенными брэгговскими отражателями (РБО) [157]. В этом случае диапазон непрерывной перестройки расширяется до нескольких десятков см^{-1} . Применение схем с внешним резонатором, включающих синхронно вращаемую дифракционную решетку, позволяет достичь диапазона непрерывной перестройки порядка 100 см^{-1} . Необходимо отметить, что в соединениях A_3B_5 ширина запрещенной зоны убывает с температурой, а в соединениях A_4B_6 — увеличивается [157]. Этим обусловлено различное направление перестройки оптической частоты с температурой, а следовательно, и при увеличении тока для лазеров этих типов.

В аналитическом спектральном диапазоне вблизи исследуемой линии поглощения тонкая перестройка лазерной частоты осуществляется с помощью тока. При непрерывном режиме генерации для тонкой подстройки частоты используется постоянная токовая подставка. В этом случае частота генерации лазера меняется как за счет разогрева кристалла при прохождении через него тока (безызлучательная оже-рекомбинация носителей), так и за счет изменения коэффициента преломления в зависимости от концентрации носителей в активной зоне [153]. Для сканирования и модуляции частоты внутри анализируемого спектрального диапазона применяется ток пилообразной формы. При использовании импульсно-периодического режима накачки перестройка и сканирование частоты лазера в исследуемом диапазоне происходит в каждом импульсе за счет нестационарного разогрева лазера в течение импульса и последующего остывания в промежутках между импульсами.

1.4.4. Спектральные свойства и шумы ПДЛ

Для спектроскопических и аналитических приложений существенными являются спектр излучения лазера и его частотные и амплитудные шумы. Ими определяются точность регистрации и идентификации аналитического спектра поглощения, спектральное разрешение метода, предельно обнаружимая величина поглощения, а также селективность детектирования различных компонентов газовой смеси.

Для высокоточного спектрального анализа существенно, чтобы используемый ПДЛ работал в одномодовом режиме, т.е. все его излучение приходилось преимущественно на одну продольную моду резонатора. В случае лазеров с резонатором типа Фабри–Перо обеспечение такого режима достигается за счет пространственного ограничения активной зоны в полупроводниковой структуре лазера [153, 156] и тщательной селекции лазерных образцов в требуемом спектральном диапазоне [164, 165]. В РОС-структурах это достига-

ется за счет контролируемой обратной связи в оптическом резонаторе. Приемлемым для спектральных и аналитических исследований считается подавление неосновных лазерных мод более 40 дБ.

Частотные и амплитудные шумы излучения ПДЛ взаимосвязаны и обусловлены одними и теми же причинами [159]. Однако амплитудные шумы сказываются на шумовой составляющей детектируемого сигнала непосредственным образом, а частотные проявляются лишь при взаимодействии излучения с каким-либо частотным дискриминатором, например, интерферометром Фабри–Перо, резонансно поглощающей средой или другим когерентным излучением при гетеродинировании. В этих случаях частотный шум преобразуется в шум амплитуды детектируемого сигнала.

Выделяют несколько основных механизмов, определяющих спектральные характеристики полупроводниковых лазеров, шумы амплитуды и частоты их излучения в режиме свободной генерации.

1.4.4.1. Механизмы, обусловленные спонтанным излучением.

Спонтанное излучение само по себе, как механизм, случайным образом изменяющий амплитуду и сбивающий фазу излучения, дает вклад в амплитудные и частотные шумы. Линия генерации лазера за счет этого эффекта имеет лоренцеву форму, а ее ширина, в соответствии с соотношением Шавлова–Таунса [166], обратно пропорциональна мощности излучения лазера. Этот механизм является общим для всех типов лазеров.

В полупроводниковых лазерах спонтанное излучение приводит к дополнительным шумам, обусловленным взаимосвязью плотности носителей и коэффициента преломления полупроводниковой среды [167–169]. Изменения концентрации электронов и, как следствие, коэффициента усиления активной среды, вызываемые спонтанным излучением, приводят к вариации показателя преломления и фазы генерации. Кроме того, вместе с числом носителей флуктуируют ток и степень нагрева активного вещества, что также вызывает дрейф частот продольных мод [169, 170]. Такая взаимосвязь флуктуаций интенсивности и фазы излучения возникает из-за асимметричности спектра усиления полупроводникового материала, в котором переходы происходят не между отдельными уровнями, а между энергетическими зонами [171]. Результатом взаимодействия плотности носителей и коэффициента преломления среды является увеличение вклада спонтанного излучения в ширину линии генерации. Для получения значения ширины линии генерации полупроводникового лазера величина, определяемая соотношением Шавлова–Таунса, должна быть умножена на $(1 + \alpha^2)$ [167]. Здесь α является отношением изменений вещественной и мнимой частей комплексного показателя преломления активной области полупроводникового лазера при изменении концентрации носителей. В зависимости от материала и структуры лазера параметр α изменяется в диапазоне от 2 до 6 [169, 172]. Необходимо отметить,

что флуктуирующая составляющая, обусловленная спонтанным излучением, имеет характер белых шумов.

1.4.4.2. Релаксационные колебания. В процессе генерации полупроводникового лазера электрон-дырочная рекомбинация приводит к увеличению оптической интенсивности и уменьшению плотности носителей. Последнее, в свою очередь, уменьшает оптическую интенсивность из-за уменьшения усиления. Таким образом, коэффициент преломления среды и, следовательно, оптическая фаза испытывают затухающие осцилляции на частоте релаксационного резонанса [173, 174]. Частота релаксационных колебаний пропорциональна квадратному корню из мощности излучения лазера и составляет, как правило, несколько ГГц. Наличие таких релаксационных колебаний приводит к эффекту, аналогичному частотной модуляции основной несущей частоты. В спектре излучения помимо компоненты на основной оптической частоте появляются симметричные сателлиты, отстоящие от основного максимума на расстояния, кратные частоте релаксационных колебаний [173]. Их интенсивность зависит от материала, структуры и рабочего режима лазера и может достигать нескольких процентов от интенсивности излучения на основной частоте [174]. При регистрации спектров поглощения с помощью одномодового ПДЛ наличие таких боковых составляющих достаточной интенсивности может привести к появлению ложных линий поглощения.

1.4.4.3. Флуктуации подвижности носителей. Флуктуации подвижности носителей, свойственные и другим полупроводниковым приборам, приводят к появлению фликкер-шума со спектром $1/f$ [169, 175, 176]. Наличие шума такого рода приводит к дополнительным шумам амплитуды и уширению линии генерации лазера, независимому от его мощности. Самое существенное, что помимо увеличения ширины происходит изменение формы линии генерации. Если влияние спонтанного излучения, имеющего спектр белого шума, дает лоренцев контур, то доминирование фликкер-шума приводит к гауссовой форме линии генерации лазера [175]. Кроме того, существенным для газоаналитических применений является то, что наличие шумовой составляющей типа $1/f$ в амплитуде лазерного сигнала ограничивает время интегрирования, применяемое для улучшения отношения сигнал/шум, делая чрезмерное накопление сигнала бессмысленным [164, 169].

1.4.4.4. Конкуренция мод. Конкуренция мод является источником дополнительных шумов, которые называются шумами разделения мод [177, 178]. Причиной их возникновения также являются флуктуации спонтанного излучения, которое способствует попеременному возбуждению различных продольных мод. Спецификой влияния данного эффекта на амплитудные шумы лазера является то, что спектр шума на одной выделенной моде оказывается на 4–5 порядков выше уровня квантового шума, а его спектральная плотность возрастает с уменьшением частоты. Поэтому, если с помощью монохроматора или другого спектрально- или пространственно-селективного метода выделить от-

дельные продольные или поперечные моды, то уровень шума в них может оказаться значительно выше, чем соответствующая величина для интегральной по спектру мощности [177, 178].

Таким образом, основные свойства собственных шумов амплитуды и интенсивности полупроводниковых лазеров можно кратко описать следующим образом.

Спектр частотных шумов. Квантовые шумы дают постоянную («белую») составляющую от нулевых частот до частоты релаксационных колебаний, находящейся в диапазоне 1–10 ГГц. Интенсивностью этих шумов определяется ширина линии генерации (при регистрации на частотах выше 1 МГц), которая может варьироваться в диапазоне 1–30 МГц. На частоте релаксационных колебаний, величина которой пропорциональна квадратному корню из интенсивности лазера, располагается резонансный пик, обуславливающий спутниковые компоненты в спектре излучения одномодового лазера. Фликкер-шум дает существенный вклад в диапазоне до 1 МГц.

Спектр шумов амплитуды. Спектр амплитудных шумов представляет собой «белое» плато в области средних частот с максимумом на частоте релаксационного резонанса (1–10 ГГц) [170, 171] и фликкерной составляющей ($1/f$), доминирующей над уровнем белых шумов на частотах менее 1 МГц.

Уровень шумов в области белого плато зависит от мощности лазера. В одномодовом режиме их интенсивность обратно пропорциональна кубу мощности лазера $(1/P_L)^3$ [177, 179]. При мощности излучения ПДЛ 0,3–0,5 мВт плотность относительной интенсивности шумов может находиться в диапазоне 10^{-12} – 10^{-14} Гц⁻¹ [177, 179], что при полосе детектирования 1 МГц соответствует относительной интенсивности шумов 10^{-6} – 10^{-8} . Вклад квантовых шумов в плотность амплитудных шумов менее 10^{-14} Гц⁻¹ и уменьшается линейно с ростом мощности лазера [171].

В условиях реального эксперимента необходимо учитывать также возможное влияние технических шумов (шумы источника тока, флуктуации температуры и др.).

1.4.5. Особенности используемых конструкций и технологий ПДЛ

Развитие технологии ПДЛ [153, 156, 180] происходит за счет применения новых материалов, структур и технологий их изготовления. Его основной целью является расширение спектрального диапазона, повышение мощности и эффективности преобразования электрической энергии в оптическое излучение, повышение рабочих температур генерации ПДЛ, повышение эффективности контроля модового состава излучения ПДЛ и увеличение надежности и времени наработки на отказ.

Наиболее простыми по структуре являются диффузионные гомолазеры, в которых инжектирующим контактом служит p - n -переход в однородном по составу полупроводнике (с различными легирующими

примесями в p - и n -областях диода) [158, 180, 181]. Они до недавнего времени использовались в среднем ИК-диапазоне и характеризуются относительно высокими мощностями излучения, до 1 мВт для соединений A_4B_6 , и стабильностью работы на протяжении длительного времени (до 10 лет). Однако им свойственны высокие пороговые токи и низкие температуры генерации, что позволяет использовать их только в импульсном режиме и при температурах до 80 К [181–183]. В настоящее время производство гомолазеров прекращено.

Использование двойных гетероструктур, представляющих собой различные комбинации гетеропереходов между разными полупроводниками и p - n -переходов, позволяет существенно снизить пороговые токи за счет ограничения толщины активной области и понижения плотности тока накачки с сохранением той же объемной плотности. Это дает возможность повысить КПД и рабочие температуры лазеров [153, 157, 158]. Кроме того, такие гетероструктуры обеспечивают не только электронное ограничение, но и предотвращают дифракционные потери излучения благодаря сильному волноводному эффекту, улучшая пространственное распределение выходящего излучения.

Для дополнительного ограничения размеров активной области применяются также полосковые структуры. Они позволяют еще более снизить пороговые токи, улучшить условия теплоотвода за счет двумерного растекания тепловой мощности в толще кристалла, улучшить модовую структуру излучения благодаря уменьшению вероятности возбуждения поперечных мод [153, 157].

Низкие пороги лазеров с двойной гетероструктурой и полосковой структурой контакта обеспечивают возможность их работы при достаточно высоких температурах в непрерывном режиме. Лазеры типа A_4B_6 генерируют, как правило, при температурах до 120–160 К, их мощности составляют 300–500 мкВт. В ряде случаев сообщалось о генерации таких лазеров при температурах близких к комнатным (выше 200 К) [184]. Перестраиваемые гетеролазеры типа A_3B_5 работают в диапазоне комнатных температур, для них характерны мощности порядка 1–10 мВт. Для гетеролазеров характерна улучшенная по сравнению с гомолазерами модовая структура.

Наиболее сложными лазерными полупроводниковыми структурами являются упоминавшиеся выше РОС- и РБО-лазеры, которые позволяют расширить диапазон непрерывной перестройки частоты лазера в отдельных модах (до нескольких десятков см^{-1}) [153, 180, 185]. Из-за технологических сложностей и высокой стоимости изготовления РОС- и РБО-структур лазеры такого типа изготавливаются в основном из A_3B_5 -соединений, генерирующих в ближнем ИК-диапазоне. Их мощность составляет обычно 3–5 мВт.

Сложные многокомпонентные лазерные структуры характеризуются, меньшими мощностями излучения. Кроме того, они более чувствительны к воздействию резких перепадов температуры, возникающих, как правило, при охлаждении до азотных температур, из-за

возникновения остаточных напряжений и упругой деформации в окрестности гетероперехода [157], которые приводят к накоплению дефектов и постепенной деградации лазера.

Упомянем об основных технологиях изготовления ПДЛ. Среди них — метод горячей стенки, жидкофазная эпитаксия и молекулярно-лучевая эпитаксия [153, 156, 158, 180]. Жидкофазная эпитаксия наиболее проста и дешева, однако обладает существенными технологическими ограничениями. Метод горячей стенки при умеренной стоимости позволяет получать слои высокого качества, но в нем существенно ограничен контроль процесса выращивания структуры. Молекулярно-лучевая эпитаксия является наиболее гибкой технологией, позволяющей производить широкий спектр технологических манипуляций и с высокой точностью контролировать параметры процесса, однако эта технология является наиболее дорогой.

1.4.6. ПДЛ как инструмент для спектральных исследований

Спектроскопия высокого разрешения является основной областью применения ПДЛ в фундаментальных исследованиях, а также информационной и методической основой для аналитических применений ПДЛ [153–155, 186, 187]. Объекты ДЛС и задачи, решаемые с ее помощью, определяются основными спектроскопическими параметрами ПДЛ. В наиболее общем виде, с учетом возможности использования различных лазерных материалов и структур, основные характеристики ПДЛ, принципиально важные для спектроскопии высокого разрешения, можно суммировать следующим образом:

перекрываемая спектральная область	0,6–40 мкм
мощность	0,2–10 мВт
диапазон непрерывной перестройки частоты	1–10 см ⁻¹
спектральное разрешение	до 10 ⁻⁴ см ⁻¹
чувствительность к оптической плотности	до 10 ⁻⁷
точность определения поглощения	до 0,1 %
быстродействие	10 ⁻⁵ –10 ² с.

В соответствии с этими техническими параметрами можно достаточно четко очертить круг решаемых задач и объектов исследования ДЛС:

— Так как мощность ПДЛ невелика, то прежде всего (за редким исключением) они используются в спектроскопии поглощения.

— Спектр поглощения исследуемого объекта должен лежать в области, перекрываемой семейством ПДЛ. Доступны для исследований электронные переходы некоторых атомарных газов, электронные и слабые запрещенные переходы в дипольно-неактивных двухатомных молекулах, спектрально разрешенные колебательно-вращательные полосы большинства газообразных молекул и молекулярных образований и некоторые вращательные линии ряда простых молекул [186, 187].

Среди объектов исследований с помощью ДЛС представлены атомы, стабильные и нестабильные молекулы, радикалы, ионы, комплексы и их различные изотопические модификации. Общее их число превышает в настоящее время 250.

— Высокое спектральное разрешение ПДЛ и обусловленные этим фактором преимущества реализуются только при применении к тем объектам, которые имеют разрешенную тонкую структуру спектров или достаточно узкие резонансные особенности шириной менее 1 см^{-1} . Во-первых, это газообразные атомы и молекулы, и, во-вторых, это достаточно простые и легкие молекулы (не более 10–14 атомов и с массой не более 150 а.е.м.).

— Достаточно высокое быстродействие ПДЛ позволяет проводить спектральные исследования различных динамических процессов в реальном масштабе времени (например, исследования динамики распределения энергии по степеням свободы в молекулах под воздействием лазерного излучения или охлаждения в соплах).

Для объектов, удовлетворяющих перечисленным выше условиям, ДЛС позволяет с высокой точностью определять положение (с точностью до $0,1\text{--}0,2 \cdot 10^{-3} \text{ см}^{-1}$) и интенсивность (с точностью около 1%) линий поглощения [153, 155, 186, 187]. ДЛС является одним из наиболее точных методов определения формы и ширины молекулярных линий поглощения. Ее применение эффективно как при низких давлениях, где доплерово уширение составляет порядка 10^{-3} см^{-1} , так и при атмосферных и более высоких давлениях для уширенных за счет столкновительного взаимодействия линий лоренцевой формы, включая промежуточные давления, где профиль линии поглощения определяется контурами Фойгта или Галатри [188]. Также актуально применение ДЛС для высокоточного измерения величины столкновительного сдвига линий поглощения.

В спектроскопии молекулярных газов данные ДЛС применяются в основном для изучения колебательно-вращательной динамики молекул и их взаимодействия, возбужденных колебательно-вращательных состояний, взаимодействия молекул при столкновениях и влияния различных факторов, таких как температура и давление, на параметры спектров поглощения [186, 187]. На основе спектральных данных определяются спектроскопические и молекулярные константы исследуемых молекул.

Параметры линий поглощения ряда молекул, измеренные различными научными группами с помощью ДЛС, накапливаются наряду с информацией, получаемой другими спектральными методами (лазерное гетеродинамирование, фурье-спектроскопия и др.), в международных банках спектроскопических данных, например HITRAN [189, 190]. В настоящее время такие банки содержат данные о нескольких десятках наиболее интенсивно исследуемых молекул. Они используются для разработки теоретических моделей, описывающих спектры молекул и предсказывающих их в тех областях, где отсутствуют эксперимен-

тальные данные, для эмуляции спектров поглощения отдельных газов или газовых смесей, например, атмосферного воздуха, в различных условиях и для прикладных исследований, включая газоанализ.

1.4.7. Диодная лазерная спектроскопия как аналитический метод

Газовый анализ — основное прикладное направление использования методов ДЛС [155]. С ее помощью реализуются очень высокие аналитические характеристики, такие как концентрационная чувствительность, точность детектирования, селективность, скорость регистрации и т. п. Метод универсален для широкого круга газообразных объектов и чрезвычайно гибок для адаптации к различным задачам газоанализа. Привлекательна простота управления параметрами излучения ПДЛ и методическая легкость регистрации спектров пропускания исследуемой газообразной среды. Малые размеры ПДЛ позволяют создавать на их базе достаточно компактные аналитические устройства.

Основные области применения газового анализа на базе ДЛС: фотохимия атмосферы, исследования трансграничного переноса и градиентов загрязнений атмосферы, изучение естественных источников атмосферных газов и их стоков, контроль техногенных загрязнений атмосферы на уровне фоновых концентраций, контроль химических технологий, контроль и совершенствование энергоемких технологий, в том числе в автомобильной, авиационной и космической индустрии [191–194].

1.4.7.1. Методы регистрации молекулярных спектров. Для регистрации молекулярных спектров и детектирования слабого резонансного поглощения с помощью ПДЛ используется несколько различных подходов, отличающихся методами накачки лазера и модуляции оптической частоты, а также способами детектирования сигнала.

Наиболее распространено использование непрерывного режима генерации ПДЛ. Спектральная область генерации и амплитуда сигнала ПДЛ выбираются за счет вариации температуры хладопровода и амплитуды постоянного тока, протекающего через лазерный диод. При самой простой реализации этой схемы сканирование частоты лазера производится за счет добавления в ток накачки пилообразной составляющей [153, 155]. Глубина модуляции тока выбирается так, чтобы в течение одного цикла сканирования регистрировался весь исследуемый участок спектра (как правило, это одна продольная мода генерации ПДЛ или окрестность исследуемой линии поглощения). Частота сканирования может составлять от десятков Гц до сотен кГц и зависит от способа дальнейшей регистрации радиочастотного сигнала. Детектирование оптического сигнала производится в широкой частотной полосе, от 0 до 3–5 МГц, зависящей от скорости сканирования. Для записи спектра используются импульсные пиковые интеграторы, цифровые осциллографы или специальная быстродействующая цифровая

техника. Специальным образом организуется регистрация оптического нулевого сигнала, для чего используется механический прерыватель.

Другой способ основан на использовании непрерывного режима генерации в сочетании с быстрой и неглубокой модуляцией тока накачки, при этом сканирование спектра производится также с помощью относительно медленной пилообразной составляющей. Частота быстрой модуляции тока лежит, как правило, в диапазоне 1–10 кГц, а сканирование занимает от сотых долей до нескольких секунд. Регистрация сигнала производится с помощью синхронного детектора на частоте быстрой составляющей или ее гармониках, что позволяет регистрировать производные спектра поглощения. Этот режим, который принято называть спектроскопией с модуляцией длины волны (МДВС), наиболее распространен [195–197]. При таком подходе регистрируемый спектр может быть оцифрован с применением достаточно медленных цифровых устройств или записан с помощью самописца. По сравнению с первым подходом в данной конфигурации существенно снижается полосу детектирования радиочастотного сигнала и достаточно просто изменяется время интегрирования, что в совокупности позволяет снизить шумы регистрации.

Описанные выше подходы используются преимущественно при спектроскопических исследованиях, когда необходимо сканировать достаточно протяженный участок спектра (до нескольких см^{-1}). В аналитических приложениях, когда целью является насколько возможно быстрое и высокочувствительное измерение величины резонансного поглощения в отдельной линии, регистрация протяженных участков спектра становится необязательной. Кроме того, целесообразным оказывается повышение частоты быстрой модуляции тока вплоть до сотен МГц. Такой подход принято называть спектроскопией с частотной модуляцией (ЧМС). От МДВС его отличает использование модулирующих частот, сравнимых или превосходящих ширину линии поглощения на полувысоте ($\sim 0,1 \text{ см}^{-1}$), т.е. от 100 МГц до нескольких ГГц, а глубины модуляции, напротив, существенно меньшей этой величины. Использование высоких частот модуляции позволяет при детектировании выйти из частотной области вблизи 100 кГц, где доминируют шумы типа $1/f$, в область ограничения дробовыми шумами, лежащую выше 100 МГц.

В свою очередь ЧМС принято делить на однотоновую и двухтоновую. В однотоновой ЧМС детектирование производится на самой частоте модуляции, выбираемой, как правило, в диапазоне 300–600 МГц. В двухтоновой ЧМС для модуляции лазера используется пара близко расположенных частот (например, 345 и 355 МГц [198]), а величина поглощения измеряется за счет демодуляции сигнала фотоприемника на разностной частоте (в упомянутом случае 10 МГц), что существенно упрощает задачу приема и усиления радиочастотного сигнала.

Принцип однотоновой ЧМС с применением сверхвысоких частот модуляции был впервые предложен и осуществлен G.C. Bjorklund,

в 1980 г. [199]. Дальнейшая разработка этой методики и конкретные схемы ее реализации, включая разнообразные применения в спектроскопии и газовом анализе, нашли отражение в работах [164, 196, 200, 201, 203]. Принцип двухтоновой ЧМС был предложен I.T. Cassidi и J. Reid, в 1982 г. [204], и применен для высоких частот модуляции D.E. Cooper и T.F. Gallagher, 1985 г. [205]. Исследованиям, развивающим этот подход, посвящены работы [198, 202, 206–213].

Деление методов, сочетающих быструю модуляцию частоты ПДЛ и синхронное детектирование сигнала, на МДВС и ЧМС достаточно условно [198]. В [197, 203], было теоретически и экспериментально показано, что МДВС является частным случаем ЧВС, в котором частота модуляции меньше, чем ширина линии поглощения. Также было продемонстрировано, что МДВС с использованием высоких частот модуляции (5–20 МГц) настолько же чувствительна, как и одно- или двухтоновая ЧМС, при существенно большей простоте реализации. В частности, нет необходимости преодолевать проблемы согласования импедансов для эффективной модуляции тока накачки на частоте нескольких сотен МГц [198].

Использование принципов ЧМС позволяет приблизиться к чувствительности регистрации оптической плотности, определяемой ограничением дробовыми шумами (10^{-7} – 10^{-8}) [200, 201, 206, 209, 210]. В этом случае при использовании полос фундаментального поглощения в среднем ИК-диапазоне и многоходовых кювет с длиной оптического пути около 50 м для многих газов достигается концентрационная чувствительность гораздо лучше 1 млрд^{-1} . При использовании обертонов и полос комбинационного поглощения достижима чувствительность, достаточная для регистрации ряда газов в концентрационном диапазоне менее 1 млн^{-1} [202, 211].

Наконец, еще один подход, распространенный в основном среди отечественных исследователей, заключается в использовании импульсно-периодического режима накачки ПДЛ, позволяющего сочетать накачку лазера со сканированием частоты генерации [155, 182, 183, 186, 187]. Именно он применяется в исследованиях, результаты которых нашли отражение в данной монографии.

Рисунок 1.1 демонстрирует принципы формирования лазерного спектра пропускания исследуемого молекулярного объекта при использовании импульсно-периодического режима накачки ПДЛ. Для накачки лазера используются периодически повторяющиеся прямоугольные или трапецевидные токовые импульсы, рис. 1.1 а. При этом для получения высокой воспроизводимости молекулярных спектров все параметры импульсов: частота повторения, длительность, амплитуда и форма, выдерживаются с достаточно высокой точностью. При прохождении импульса тока через лазер помимо генерации излучения происходит нестационарный разогрев лазерного кристалла, приводящий к перестройке частоты генерации. В результате, при детектировании радиочастотной составляющей лазерного сигнала в течение импульса