

Возможности анализа состава выдыхаемого воздуха с помощью рамановской спектроскопии

Д.В.Петров, И.И.Матросов, М.А.Костенко

Разработан рамановский спектрометр газовых сред, имеющий предельную чувствительность на уровне 100 ppb. Проведенная экспериментальная апробация на образцах выдыхаемого воздуха людей, не имеющих заболеваний, подтвердила возможность контроля содержания ряда углеводородных соединений и $^{13}\text{CO}_2$. Намечены пути дальнейшего развития данного аналитического метода.

Ключевые слова: рамановская спектроскопия, газоанализ, выдыхаемый воздух, диагностика заболеваний.

1. Введение

Диагностика заболеваний по составу выдыхаемого воздуха (ВВ) является многообещающим направлением современной медицины. Данный метод основан на том, что в ВВ, помимо компонентов атмосферы (N_2 , O_2 , CO_2 и H_2O), содержатся следовые концентрации других молекул, являющихся продуктом протекающих в организме биохимических процессов. Многие из таких соединений (например, CO , NO , H_2 , CH_4 , $^{13}\text{CO}_2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ и т.д.) обладают очень высокой специфичностью и могут быть использованы в качестве биомаркеров заболеваний [1–3]. Привлекательность данного метода обуславливается в первую очередь тем, что он является неинвазивным, т.е., во-первых, безопасным, ввиду невозможности заражения инфекциями, передающимися через кровь или инструментов, во-вторых, пациенту не приходится испытывать физический и эмоциональный дискомфорт.

На сегодняшний день наиболее распространенным методом определения состава ВВ является хромато-масс-спектрометрия [4–7]. Данный подход обладает очень высокой чувствительностью, но требует расходных материалов, сложной пробоподготовки, высококвалифицированного обслуживания и не позволяет проводить измерения в режиме реального времени. Этих недостатков лишены методы, основанные на оптической спектроскопии. Наиболее распространена диагностика состава ВВ с помощью абсорбционной спектроскопии, где в качестве источников излучения используются перестраиваемые диодные ИК лазеры [8–11]. Данный подход характеризуется высокой селективностью вкуче с чувствительностью до долей ppb. В свою очередь, он обладает двумя особенностями. Во-первых, гомоядерные двухатомные молекулы не поглощают излучение ИК диапазона. С одной сто-

роны, это хорошо, т.к. облегчается идентификация примесей на фоне азота и кислорода, с другой стороны, это не позволяет измерять, например, концентрацию водорода, производимого кишечными бактериями и являющегося индикатором расстройства желудочно-кишечного тракта и проблем с мальабсорбцией углеводов [7, 12–14]. Во-вторых, учитывая сравнительно небольшую перестройку по длине волны, метод абсорбционной спектроскопии не позволяет измерять большое число газовых компонентов с помощью одной пары «излучатель–приемник», что существенно ограничивает его применимость.

Указанных недостатков лишена рамановская спектроскопия. Суть данного метода заключается в рассеянии молекулами среды возбуждающего лазерного излучения на определяемых их внутренним строением частотах, при этом интенсивность информативных рассеянных сигналов прямо пропорциональна концентрации рассеивающих молекул. Основным преимуществом данной аналитической техники перед абсорбционной ИК спектроскопией является возможность одновременного контроля всех молекулярных составляющих анализируемой среды с помощью одного лазера с фиксированной длиной волны, работающего в видимом диапазоне. Долгое время применению данного подхода в газоанализе мешало отсутствие инструментальной базы, позволяющей регистрировать рамановские спектры с высоким отношением сигнал/шум. Однако в последнее десятилетие ситуация изменилась ввиду появления высокочувствительных многоканальных фотодетекторов и узкополосных голографических фильтров, а также благодаря разработке специальных технических решений, направленных на повышение интенсивности регистрируемых сигналов [15–19]. Это позволило обеспечить предельную чувствительность метода на уровне 1 ppm [20–22]. Потенциал рамановского газоанализа ранее был продемонстрирован на примере анализа состава атмосферного воздуха [21, 23] и топливных газов [24–27], в том числе с помощью лидарной техники [28–30]. Помимо этого, рядом научных групп были описаны перспективы применения такого подхода для анализа состава ВВ [22, 31–33]. Целями настоящей работы являлись повышение чувствительности до значения

Д.В.Петров. Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, Россия, 634055 Томск, просп. Академический, 10/3; Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; e-mail: dpetrov@imces.ru

И.И.Матросов, М.А.Костенко. Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, Россия, 634055 Томск, просп. Академический, 10/3

Поступила в редакцию 26 февраля 2021 г.

ниже 1 ppm и экспериментальная апробация данного метода на образцах ВВ.

2. Экспериментальная установка

Основная проблема, которая стоит перед разработчиком рамановского спектрометра газовых сред, – это обеспечение высокой интенсивности информативных рассеянных сигналов. Наиболее эффективным подходом для этого является сжатие анализируемой газовой среды, поскольку интенсивность сигналов практически линейно зависит от давления [34]. Апробация данного подхода ранее была проведена в работе [20], где было получено увеличение сигналов примерно в 50 раз. Помимо этого, заслуживает внимания метод увеличения интенсивности, основанный на многопроходном возбуждении рассеяния. В работах [16, 33] было показано, что он позволяет увеличить сигнал до 20 раз. Принимая во внимание, что одновременное использование данных подходов обеспечит мультипликативный эффект, они были положены в основу разработанной установки, схема которой показана на рис.1.

Суть работы установки заключается в следующем. Перед каждым анализом с помощью форвакуумного насоса из всей газотранспортной части, включая кювету, откачивается воздух. Проба ВВ направляется в предварительный контейнер, способный увеличиваться в объеме до 3 литров. Данный контейнер соединен с безмасляным компрессором, который сжимает пробу в кювете объемом 30 см^3 до давления 20 атм. После этого начинается процесс регистрации рамановского спектра. Излучение от непрерывного лазера мощностью 5 Вт ($\lambda = 532\text{ нм}$) направляется в кювету, с торцов которой установлена многопроходная оптическая система, описанная в работе [33]. В результате многократных отражений от сферических зеркал, расположенных концентрически, в центре кюветы образуются две области пересечения лазерных пучков. Каждая из них является источником рассеянного света, в котором интенсивность возбуждающего лазерного излучения пропорциональна числу его проходов. Образующееся рассеянное излучение собирается с помощью линзового объектива с относительным отверстием 1:1.8, установленного на расстоянии от центра кюветы, равном фокусному расстоянию. Пройдя сквозь notch-фильтр (для ослабления рэлеевского рассеяния), собранное излучение направляется с помощью аналогичного линзового объектива на входную щель спектрального прибора МКР-2

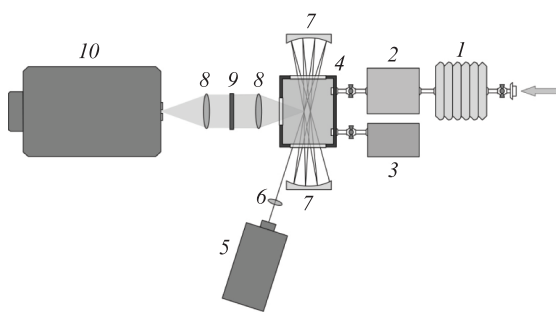


Рис.1. Схема экспериментальной установки:

1 – контейнер для анализируемой пробы воздуха; 2 – безмасляный компрессор; 3 – форвакуумный насос; 4 – газовая кювета; 5 – лазер; 6 – линза; 7 – сферические зеркала; 8 – линзовые объективы; 9 – notch-фильтр; 10 – спектральный прибор.

(ООО «Сибаналитприбор», Россия). Данный спектральный прибор оснащен ПЗС-матрицей Hamamatsu S10141 (512×2048 пикселей) и обеспечивает одновременную регистрацию спектра в диапазоне 532–680 нм. Указанный диапазон при возбуждении рамановских спектров лазерным излучением с длиной волны 532 нм эквивалентен диапазону частотных сдвигов 0–4000 см^{-1} . Использование такого диапазона позволяет одновременно контролировать содержание всех молекул, концентрация которых превышает пороговое значение. Оценка достигнутой чувствительности будет приведена ниже.

Нами были зарегистрированы спектры двух образцов ВВ, полученных от двух молодых людей (30–35 лет), не имеющих хронических заболеваний. Испытуемые не курят и не имеют жалоб на здоровье. Время забора проб ВВ от последнего приема пищи составляло более двух часов. Испытуемый делал глубокий вдох непосредственно перед взятием пробы и, без задержки дыхания, полный выдох, вторая половина которого направлялась в пробоотборник. В дополнение к этому был зарегистрирован спектр воздуха в лаборатории, где находилась экспериментальная установка, поскольку им дышали испытуемые. Время регистрации каждого спектра составляло 500 с.

3. Обсуждение результатов

На рис.2 приведен полученный рамановский спектр ВВ. Его основную часть занимают фундаментальные полосы азота (2330 см^{-1}) и кислорода (1555 см^{-1}), которые, ввиду ограниченного динамического диапазона детектора, находятся в насыщении. На низкочастотном крыле кислорода находится ферми-дублет диоксида углерода ($1285\text{ см}^{-1}/1388\text{ см}^{-1}$). Следующей по интенсивности является полоса паров воды (3652 см^{-1}). Важно отметить, что, за счет сжатия пробы, водяной пар частично конденсировался, и интенсивность наблюдаемой полосы была пропорциональна давлению его насыщенных паров при комнатной температуре.

Наиболее различия в полученных спектрах наблюдались в диапазоне $2650\text{--}3150\text{ см}^{-1}$ (рис.3). В спектре атмосферного воздуха в данном диапазоне проявлялись только обертоны кислорода (3088 см^{-1}) и пик метана (2917 см^{-1}). В спектрах ВВ наблюдалось значительно больше пиков. В первую очередь, это обусловлено тем, что, за счет увеличенной концентрации диоксида углерода, на частотах 2673, 2990 и 3022 см^{-1} проявлялись полосы его обертонов и составных частот [35]. Помимо этого, значи-

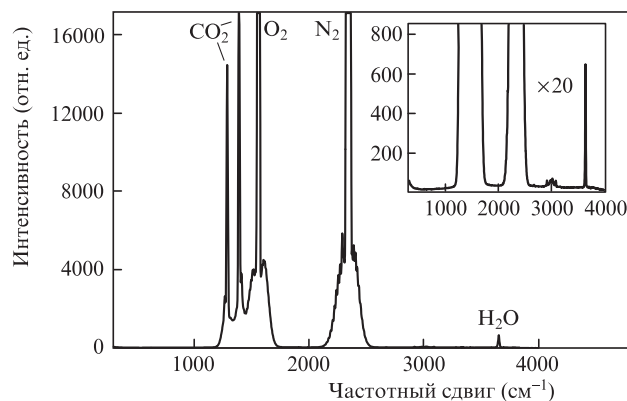


Рис.2. Рамановский спектр выдыхаемого воздуха в диапазоне 300–4000 см^{-1} .

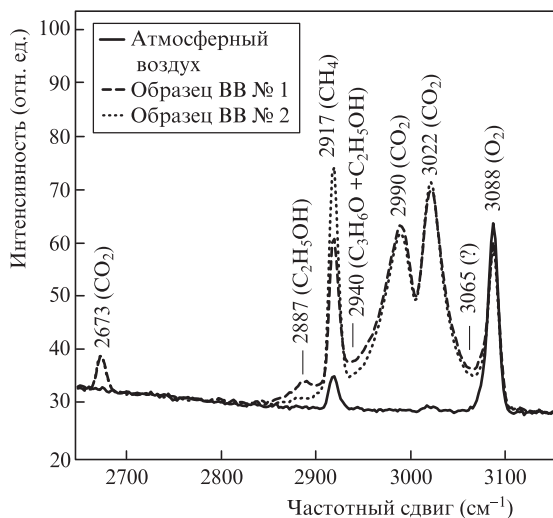


Рис.3. Рамановские спектры атмосферного и выдыхаемого воздуха в диапазоне 2650–3150 см^{-1} .

тельно увеличена интенсивность пика метана для обоих образцов ВВ. Принимая во внимание тот факт, что его концентрация в атмосферном воздухе составляет 2 ± 0.1 ppb, можно заключить, что в образцах ВВ она была равна приблизительно 9 и 14 ppb. Отметим, что концентрация метана до 10 ppb считается нормой [36], а превышение этого значения указывает на проблемы с желудочно-кишечным трактом [12]. В свою очередь, в спектре образца № 1 по сравнению со спектром образца № 2 наблюдалась увеличенная интенсивность в области частот 2887, 2940, 2990 и 3065 см^{-1} . Частоту 2940 см^{-1} имеет ацетон, который достаточно часто встречается в ВВ [37, 38]. Пик с максимумом на 2887 см^{-1} , наиболее вероятно, соответствует этанолу, который также дает вклад в интенсивность максимума в области 2940 см^{-1} . Однако присутствием этих двух молекул не объяснить увеличенную интенсивность максимумов в области 2990 и 3065 см^{-1} . Поскольку данный диапазон характерен для валентных C–H-колебаний, можно утверждать, что в образце № 1 находятся другие углеводородные соединения, однако их идентификация требует более глубокого анализа.

Помимо рассмотренного выше спектрального диапазона, различия между спектрами ВВ наблюдались вблизи частот 1320 и 1370 см^{-1} на фоне линий ферми-дублета диоксида углерода (рис.4). Поскольку разница в интенсивностях превышала уровень шума более чем на порядок, то это было обусловлено различным содержанием присутствующих молекул в анализируемых образцах ВВ. Отклонение в интенсивности на частоте 1370 см^{-1} указывает на вариацию относительной концентрации изотопа ^{13}C [39], которая может находиться в пределах $\pm 3\%$ для здоровых людей [40]. В свою очередь, отношение концентраций $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ может быть использовано для выявления инфицирования бактерией *Helicobacter pylori* [8, 11, 41, 42] посредством ^{13}C -уреазного теста. Различие в интенсивностях пиков на частоте 1320 см^{-1} , наиболее вероятно, связано с изменением содержания NO_2 , который, в свою очередь, является одним из индикаторов легочных заболеваний [43, 44]. Отметим, что в настоящей работе мы не производили точных вычислений изменения концентраций указанных выше компонентов. Для этого необходим корректный учет спектров доминирующих компонентов (O_2 , CO_2 , CH_4 , H_2O), который целе-

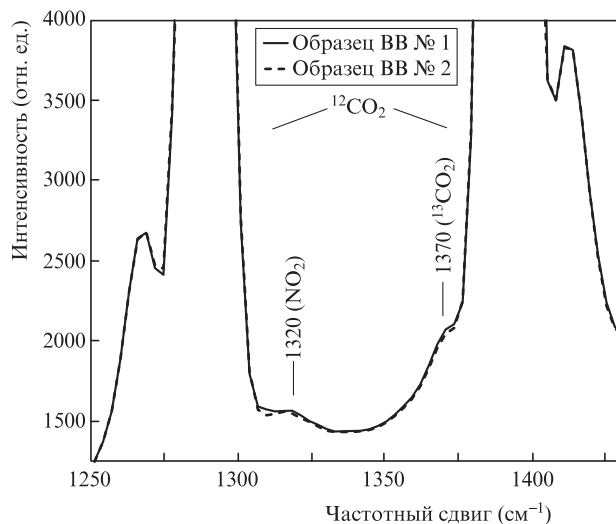


Рис.4. Рамановские спектры выдыхаемого воздуха в диапазоне 1250–1430 см^{-1} .

сообразно будет сделать при обработке большего числа образцов ВВ.

Оценим предельную чувствительность разработанной экспериментальной установки. В соответствии со спектром атмосферного воздуха, отношение сигнал/шум, определенное в виде отношения пиковой интенсивности полосы метана (2917 см^{-1}) к среднеквадратичному отклонению шума, составило ~ 20 . С учетом того, что концентрация метана в атмосфере составляет примерно 2 ppb, предельная чувствительность установки находится на уровне 100 ppb. Поскольку каждый сорт молекул имеет свое сечение рассеяния [45], то и предельные чувствительности для них будут различны [25]. Однако принимая во внимание, что большинство углеводородных соединений имеют сечение рассеяния, близкое к таковому для метана или превышающее его, можно утверждать, что для большинства летучих органических соединений в ВВ предельная чувствительность составляет ~ 100 ppb. Согласно [2, 3], прибор с указанной чувствительностью может быть использован для контроля таких биомаркеров, как ацетон, оксид углерода, метан, водород, аммиак, изопрен, этанол, метанол. Стоит отметить, что данное значение чувствительности может быть дополнительно улучшено минимум на порядок за счет использования более мощного лазера (например, 10 Вт) в комплекте с фотодетектором, охлаждаемым до -70 $^{\circ}\text{C}$, и/или увеличения времени регистрации спектра. Это позволит значительно расширить спектр контролируемых биомаркеров. С другой стороны, при наличии задач, для которых достаточно чувствительности на уровне 1 ppb, возможно проведение измерений без сжатия пробы или накопления (т.е. анализ можно будет проводить один раз в секунду).

4. Заключение

Нами продемонстрированы возможности рамановской спектроскопии при анализе состава выдыхаемого воздуха. Предельная чувствительность разработанной экспериментальной установки составила ~ 100 ppb для углеводородных соединений. Несмотря на то что данный метод на текущий момент обладает меньшей чувствительностью, чем абсорбционная спектроскопия, он может быть использован для комплексного контроля всех молекулярных со-

единений анализируемого воздуха, содержание которых превышает указанную концентрацию. Это является преимуществом перед ИК сенсорами и может быть полезно при поиске новых биомаркеров. В свою очередь, для обеспечения точности измерений отдельных сортов молекул, близкой к таковой у абсорбционной спектроскопии, необходимо улучшение чувствительности примерно на два порядка. Стоит отметить, что регистрируемые рамановские спектры могут быть использованы как для качественного определения биомаркеров (посредством сопоставления частот наблюдаемых пиков с табличными данными или путем сравнения спектров с эталонными), так и для получения информации об отклонениях в составе выдыхаемого воздуха без детальной расшифровки спектров посредством использования современных методов обработки, таких как нейронные сети и машинное обучение.

1. Popov T.A. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, **106**, 451 (2011).
2. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 553 (2007).
3. Mazzatenta A., Di C., Pokorski M. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **187**, 128 (2013).
4. Henderson B., Khodabakhsh A., Metsälä M., Ventrillard I., Schmidt F.M., Romanini D., Ritchie G.A.D., Lintel Hekkert S., Briot R., Risby T., Marczin N., Harren F.J.M., Cristescu S.M. *Appl. Phys. B*, **124**, 161 (2018).
5. Kim K.H., Jahan S.A., Kabir E. *Trends Anal. Chem.*, **33**, 1 (2012).
6. Mathew T., Pownraj P., Abdulla S., Pullithadathil B. *Diagnostics*, **5**, 27 (2015).
7. Wang C., Sahay P. *Sensors*, **9**, 8230 (2009).
8. Степанов Е.В. *Квантовая электроника*, **32**, 981 (2002) [*Quantum Electron.*, **32**, 981 (2002)].
9. Дьяченко А.И., Степанов Е.В., Шулагин Ю.А. *Оптика и спектроскопия*, **128**, 1042 (2020) [*Opt. Spectrosc.*, **128**, 1048 (2020)].
10. Степанов Е.В., Касоев С.Г. *Оптика и спектроскопия*, **126**, 810 (2019) [*Opt. Spectrosc.*, **126**, 736 (2019)].
11. Ивашкин В.Т., Касоев С.Г., Степанов Е.В. *Оптика и спектроскопия*, **126**, 788 (2019) [*Opt. Spectrosc.*, **126**, 710 (2019)].
12. Le Marchand L., Wilkens L.R., Harwood P., Cooney R.V. *Environ. Health Perspect.*, **98**, 199 (1992).
13. Rumessen J.J., Nordgaard-Andersen I., Gudmand-Høyer E. *Scand. J. Gastroenterol.*, **29**, 826 (1994).
14. Ledochowski M., Widner B., Murr C., Sperner-Unterweger B., Fuchs D. *Scand. J. Gastroenterol.*, **36**, 367 (2001).
15. Knebl A., Yan D., Popp J., Frosch T. *Trends Anal. Chem.*, **103**, 230 (2018).
16. Schlüter S., Krischke F., Popovska-Leipertz N., Seeger T., Breuer G., Jeleazcov C., Schüttler J., Leipertz A. *J. Raman Spectrosc.*, **46**, 708 (2015).
17. Fedorov S.Y., Boyarshinov B.F. *Instr. Exp. Tech.*, **60**, 237 (2017).
18. Wang P., Chen W., Wan F., Wang J., Hu J. *Opt. Express*, **27**, 33312 (2019).
19. Petrov D.V., Zaripov A.R., Toropov N.A. *Opt. Lett.*, **42**, 4728 (2017).
20. Petrov D.V., Matrosov I.I., Tikhomirov A.A. *J. Appl. Spectrosc.*, **82**, 120 (2015).
21. Hanf S., Keiner R., Yan D., Popp J., Frosch T. *Anal. Chem.*, **86**, 5278 (2014).
22. Gomez Velez J., Muller A. *Opt. Lett.*, **45**, 133 (2020).
23. Petrov D.V., Matrosov I.I., Zaripov A.R. *J. Mol. Spectrosc.*, **348**, 137 (2018).
24. Eichmann S.C., Weschta M., Kiefer J., Seeger T., Leipertz A. *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 125104 (2010).
25. Petrov D.V., Matrosov I.I., Zaripov A.R., Maznoy A.S. *Appl. Spectrosc.*, **74**, 948 (2020).
26. Gao Y., Dai L.-K., Zhu H.-D., Chen Y.-L., Zhou L. *Chinese J. Anal. Chem.*, **47**, 67 (2019).
27. Buldakov M.A., Korolev B.V., Matrosov I.I., Petrov D.V., Tikhomirov A.A. *J. Appl. Spectrosc.*, **80**, 124 (2013).
28. Привалов В.Е., Шеманин В.Г. *Измерительная техника*, №9, 22 (2016) [*Meas. Tech.*, **59**, 933 (2016)].
29. Бобровников С.М., Горлов Е.В., Жарков В.И. *Оптика атмосф. океана*, **26** (1), 70 (2013) [*Atmos. Ocean. Opt.*, **26** (4), 320 (2013)].
30. Жевлаков А.П., Беспалов В.Г., Данилов О.Б., Завьялов А.К., Ильинский А.А., Кашеев С.В., Конопелько Л.А., Мак А.А., Гришканич А.С., Елизаров В.В. *Оптический журнал*, **87**, 16 (2020) [*J. Opt. Technol.*, **87**, 11 (2020)].
31. Chow K.K., Short M., Lam S., McWilliams A., Zeng H. *Med. Phys.*, **41**, 092701 (2014).
32. Bögözi T., Popp J., Frosch T. *Bioanalysis*, **7**, 281 (2015).
33. Petrov D.V. *Appl. Opt.*, **55**, 9521 (2016).
34. Petrov D.V., Matrosov I.I. *J. Raman Spectrosc.*, **48**, 474 (2017).
35. Tejada G., Maté B., Montero S. *J. Chem. Phys.*, **103**, 568 (1995).
36. Stacewicz T., Bielecki Z., Wojtas J., Magryta P., Mikolajczyk J., Szabra D. *Opto-electronics Rev.*, **24**, 82 (2016).
37. Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.N. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **729**, 75 (1999).
38. Risby T.H., Solga S.F. *Appl. Phys. B*, **85**, 421 (2006).
39. Howard-Lock H.E., Stoicheff B.P. *J. Mol. Spectrosc.*, **37**, 321 (1971).
40. Epstein S., Zeiri L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 1727 (1988).
41. Crosson E.R., Ricci K.N., Richman B.A., Chilese F.C., Owano T.G., Provencal R.A., Todd M.W., Glasser J., Kachanov A.A., Paldus B.A., Spence T.G., Zare R.N. *Anal. Chem.*, **74**, 2003 (2002).
42. Som S., De A., Banik G.D., Maity A., Ghosh C., Pal M., Daschakraborty S.B., Chaudhuri S., Jana S., Pradhan M. *Sci. Rep.*, **5**, 1 (2015).
43. Chérot-Kornobis N., Hulo S., Edmé J.L., De Broucker V., Matran R., Sobaszek A. *BMC Res. Notes*, **4**, 202 (2011).
44. Kharitonov S.A., Barnes P.J. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 1693 (2001).
45. Schrötter H.W., Klöckner H.W., in *Raman Spectroscopy of Gases and Liquids*. Ed. by A. Weber (Berlin: Springer-Verlag, 1979).