Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук»

На правах рукописи

Бухарина Айгуль Булатовна

ИОНИЗАЦИЯ МОЛЕКУЛ ИЗЛУЧЕНИЕМ ЛАЗЕРНОЙ ПЛАЗМЫ В МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1.3.19. Лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Никифоров Сергей Михайлович

Москва – 2022

Оглавление

Оглавление ... 2

Введение ... 5

Глава 1 Обзор литературы ... 10

1.1 Масс-спектрометрия летучих органических соединений ... 10

1.2 Фотоионизация при атмосферном давлении ... 13

1.3 Прямой анализ в режиме реального времени ... 15

1.4 Химическая ионизация при атмосферном давлении ... 16

1.5 Вторичная ионизация электрораспылением ... 17

1.6 Масс-спектрометрия выделенных ионов в потоке ... 18

1.7 Масс-спектрометрия с реакцией переноса протона ... 19

1.8 Плазма как ионизатор для окружающего газа. ... 21

1.9 Ионизация излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении ... 22

1.10 Плазма оптического пробоя в газах как ионизатор органических соединений (ALADIN) .. 24

1.11 Лазерная плазма ... 26

1.12 Излучение плазмы ... 30

1.13 Лазерная плазма, создаваемая субнаносекундными импульсами ... 33

1.14 Применение в спектроскопии. ... 35

1.15 Летучие органические соединения живых организмов ... 36

1.16 Летучие органические соединения человека ... 36

1.17 Значимость метода получения масс-спектров ионов ЛОС без пробоподготовки ... 40

Выводы по главе 1 ... 40

Глава 2 Ионизация ЛОС излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении ... 42

2.1 Ионный источник ... 42

2.2 Спектральные и временные параметры излучения лазерной плазмы ... 45

2.3 Поглощение УФ излучения в газах ... 49

2.4 Зависимость ионного тока ионов аналита от частоты следования и энергии импульсов излучения лазера 52

2.5 Состав первичных ионов 54

2.6 Влияние времени дрейфа в плотном газе на состав регистрируемых ионов 58

2.7 Образование ионов аналитов в ионном источнике APLPI 61

2.8 Сравнение относительной эффективности ионизации в различных газовых средах 67

2.9 Определение чувствительности, порогов обнаружения и вероятности ионизации 68

2.10 Зависимость выхода ионов от давления в камере ионизации 68

2.11 Эксперименты по определению характеристик метода 69

2.12 Определение коэффициента пропускания масс-спектрометра 71

2.13 Предел обнаружения метода 72

2.14 Качественное описание механизма формирования ионов 75

Выводы по главе 2 76

Глава 3 Применение метода для анализа ЛОС пищевых продуктов, животных и человека ... 78

2.1 Методы выделения информации из масс-спектрометрических данных 79

2.2 Экспериментальная установка для анализа ЛОС реальных объектов 80

2.3 Анализ продуктов питания 81

2.4 Анализ летучих соединений, выделяемых йогуртами при комнатной температуре образца 82

2.5 Анализ кофе 83

2.6 Масс-спектрометрический анализ биологических образцов. 86

2.7 Применение метода для определения животных, инфицированных гепатокарциномой. 88

2.8 О возможности применения метода для определения врожденных уропатий у детей. 94

Выводы к главе 3 97

Заключение 98

Список используемых сокращений 99

Список цитируемой литературы 100

Список публикаций автора по теме диссертационной работы 109

Список докладов на конференциях по теме диссертационной работы 110

Благодарности..... 113

Введение

Актуальность темы работы

Масс-спектрометрия органических соединений в последнее время становится одним из широко применяемых методов исследования в биологии, медицине, химии, экологии. В силу огромного разнообразия физико-химических свойств органических соединений, одной из основных проблем при разработке методов анализа становится процесс получения ионов в ионном источнике масс-спектрометра. В настоящее время широко применяются ионные источники, работающие при атмосферном давлении и использующие различные принципы ионизации. К ним относится источник, реализующий метод ионизации летучих органических соединений (ЛОС) импульсным излучением лазерной плазмы, предложенный ранее в Лаборатории лазерной диагностики ИОФРАН и получивший название Atmospheric Pressure Laser Plasma Irradiation, APLPI [1]. В первых работах была показана возможность его применения для анализа органических соединений, однако детального исследования механизмов образования ионов в различных условиях не проводилось.

Одним из важных и перспективных направлений использования данного метода ионизации является масс-спектрометрия ЛОС биологических объектов, направленная на применение в медицине, биологии, экологии. Метод позволяет проводить анализ без пробоподготовки, что резко сокращает время анализа. При этом применение для ионизации ЛОС лазерной плазмы - импульсного источника излучения с широким спектром позволяет ионизовать практически любые органические соединения, что обеспечивает как «широкополосность» анализа, так и высокую чувствительность.

Образование ионов органических соединений происходит при атмосферном давлении газов в ионном источнике масс-спектрометра. Для определения параметров источника необходимо исследовать каналы формирования ионов и влияния состава газов на процесс ионизации. Это позволит определить условия, при которых реализуется высокая чувствительность метода. Влияние состава газов на процесс образования ионов ранее не исследовалось.

Актуальной задачей является демонстрация возможности применения метода для выявления патологических изменений организма на основе анализа масс-спектров ЛОС. В этом случае может быть реализовано важное преимущество рассматриваемого метода – возможность ионизации органических соединений различного состава с высокой эффективностью. Успешное решение этой задачи позволит применить результаты в клинических условиях для диагностики патологических процессов. В настоящее время одним из перспективных подходов в этой области

является применение методов машинного обучения и методов математической статистики к обработке масс-спектрометрических данных.

Цели и задачи работы

Целью данной работы является разработка метода лазерной масс-спектрометрии для анализа летучих органических соединений биологических образцов.

Для достижения заявленной цели были поставлены и решены следующие *задачи*:

1. Выбор лазера для создания плазмы, обеспечивающей эффективную ионизацию летучих органических соединений в ионном источнике масс-спектрометра. Определение временных и спектральных характеристик излучения лазерной плазмы, создаваемой на поверхности металлической мишени излучением выбранного лазера.

2. Определение каналов образования положительных ионов ЛОС, принадлежащих к различным химическим классам и образующихся в воздухе, азоте и аргоне под действием излучения лазерной плазмы.

3. Определение основных аналитических характеристик метода: пределов обнаружения, чувствительности, вероятности ионизации молекул органических соединений в ионном источнике при атмосферном давлении воздуха, азота и аргона.

4. Исследование применимости разработанного метода детектирования ЛОС жидких биологических образцов без пробоподготовки для выявления патологических изменений организма.

Научная новизна

1. Впервые проанализированы каналы формирования ионов органических соединений различных классов при ионизации импульсным УФ излучением лазерной плазмы, создаваемой на поверхности металла, в воздухе, азоте и аргоне при атмосферном давлении. Показано, что в зависимости от химического класса органического соединения и состава газовой среды основными положительными ионами ЛОС являются протонированные молекулы, молекулярные ионы и продукты реакций электрофильного присоединения и окисления.

2. Впервые определены основные аналитические характеристики метода: эффективность ионизации, чувствительность и предел обнаружения при детектировании органических соединений различных химических классов в аргоне, азоте и воздухе.

3. Разработан метод масс-спектрометрического анализа жидких биологических образцов, основанный на ионизации летучих органических соединений в аргоне при атмосферном давлении импульсным УФ излучением лазерной плазмы.

4. Предложенный метод впервые применен для анализа ЛОС жидких биологических образцов. Показана возможность выявления патологических процессов в организме по изменению масс-спектров ЛОС.

Положения, выносимые на защиту:

1. Излучение лазерной плазмы, спектр которого на начальном этапе существования плазмы находится в области вакуумного ультрафиолета, обеспечивает фотоионизацию соединений в газе.

2. Эффективность образования ионов ЛОС в методе APLPI определяется условиями распространения УФ излучения в газовой среде.

3. Первичными ионами, образующимися под действием импульсного УФ излучения лазерной плазмы в газах, являются ионы молекул воды, азота, кислорода и аргона, присутствующие в газах в виде примесей.

4. Образование положительных ионов ЛОС в методе APLPI зависит от химических свойств соединений и происходит, помимо протонного обмена, путем фотоионизации, электрофильного присоединения и окисления с последующей ионизацией.

5. Анализ полученных методом APLPI масс-спектров позволяет выявлять патологические процессы в живых организмах

Теоретическая и практическая значимость работы

На основе проведенных исследований в данной работе показано, что ионизация летучих органических соединений ультрафиолетовым излучением лазерной плазмы является эффективным и перспективным методом получения ионов. Практическая ценность работы заключается в демонстрации возможности проведения масс-спектрометрического анализа ЛОС биологических образцов без пробоподготовки за время менее 3-х минут. Разработанный метод может успешно применяться для анализа реальных биологических объектов, в частности, для выявления патологий животных и человека по масс-спектрам ЛОС.

Достоверность и методы исследования

Достоверность и надежность представленных в диссертационной работе результатов обеспечивается использованием современного оборудования, воспроизводимостью

экспериментальных результатов и подтверждается апробацией работы в научных статьях и конференциях. Состав и чистота исследуемых аналитов и газовых сред подтверждаются паспортами образцов, составленных производителями.

Личный вклад автора

Все изложенные в диссертации оригинальные результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором был проведен критический анализ научной литературы. Исследования, результаты которых приведены в данной работе, были выполнены лично автором или при определяющем его участии и заключались в разработке методов исследования, проектировании и сборке системы подачи проб, проведении необходимых расчетов, экспериментальных измерений и обработке масс-спектрометрических данных. Автор принимал непосредственное участие в обсуждении полученных результатов, презентации результатов на конференциях и оформлении их в виде научных публикаций. Работа выполнялась в Институте общей физики им. А.М. Прохорова Российской Академии Наук в Лаборатории лазерной диагностики.

Апробация работы

Основные результаты проведенных в работе исследований докладывались автором лично в 13 докладах на международных и всероссийских конференциях, в том числе: Всероссийских конференциях с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» (2019, 2021); Школах-конференциях молодых учёных «Прохоровские недели» (2018-2021); Конференциях МФТИ, (2018-2020); 18,19 International Conferences Laser Optics, Международных конференциях по фотонике и информационной оптике (2019, 2020); Международной конференции «Лазерные, плазменные исследования и технологии» ЛаПлаз-2019. На школах-конференциях молодых ученых «Прохоровские недели» в 2018 и 2019 году диссертант был награжден почетными грамотами за доклады.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 работ в рецензируемых журналах, входящих в базы цитирования WoS и Scopus, из них 3 статьи в изданиях, включенных в перечень рецензированных научных изданий ВАК. Список публикаций приведён в отдельном списке на странице 109.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, трех глав и заключения. Список литературы содержит 172 наименования. Объем диссертации 113 страниц, в том числе 46 рисунков и 9 таблиц.

Во *введении* формулируется цель и задачи работы, показана научная новизна и значимость полученных результатов, перечислены защищаемые положения и приводится краткое содержание диссертационной работы по главам.

В *главе 1*, являющейся обзором литературы, представлен анализ основных процессов формирования плазмы на поверхности металлической мишени создаваемой субнаносекундным лазерным излучением, по литературным данным был проведен анализ основных процессов, приводящих к ионизации летучих органических соединений, рассмотрены основные методы получения ионов в масс-спектрометрии ЛОС, описаны каналы ионизации рассмотренных методов. Анализ литературных данных показал, что предложенный метод ионизации ЛОС излучением лазерной плазмы (Atmospheric Pressure Laser Plasma Irradiation, APLPI [1]) является перспективным для применения в масс-спектрометрии. Однако, важные для развития метода вопросы не были изучены. Такими вопросами являются: характеристика лазерной плазмы как источника излучения, влияние состава газа, в котором происходит ионизация ЛОС при атмосферном давлении. Наконец важными характеристиками метода, ранее не определёнными экспериментально, являются пределы обнаружения и чувствительности метода.

В *главе 2* описан метод масс-спектрометрического анализа летучих органических соединений при атмосферном давлении без пробоподготовки, основанный на ионизации органических соединений ультрафиолетовым излучении лазерно-индуцированной плазмы на поверхности металлической мишени. Представлены описания экспериментальных установок, приведены измеренные характеристики излучения лазерной плазмы. Описаны механизмы и каналы ионизации летучих органических соединений. Проанализировано влияние различных газовых сред на процесс ионизации. Приведены основные характеристики метода, такие как чувствительность, вероятность ионизации, предел обнаружения. Проведено сравнение основных характеристик метода.

В *главе 3* впервые предложена и реализована методика применения разработанного метода масс-спектрометрического анализа летучих органических соединений реальных биологических объектов без пробоподготовки. Используя разработанную методику в сочетании с методами математической статистики и методами машинного обучения показана возможность классификации проб на группы.

В *заключении* сформулированы основные выводы диссертационной работы.

В *конце работы* представлен список цитируемой литературы, перечень работ автора, указатель часто используемых сокращений, а также благодарности автора диссертации.

Глава 1 Обзор литературы

На данный момент одной из областей, в которой наблюдается активное развитие лазерных масс-спектрометрических методов исследования, является разработка методов анализа летучих органических соединений (ЛОС). Интерес к анализу ЛОС обусловлен возможными применениями в различных областях от решения экологических задач до применения в медицине. Сложность задачи масс-спектрометрического анализа обусловлена огромным количеством химических соединений различных классов, формирующих общую картину. Так ЛОС человека, или «волатолом», по последним данным содержит более 2577 соединений [2].

Эффективность масс-спектрометрического анализа ЛОС во многом определяется способом ионизации органических соединений. Метод ионизации должен обеспечивать преобладание молекулярных ионов, обладать минимальной селективностью по классам химических соединений и обеспечивать высокую вероятность ионизации.

Существует множество методов ионизации, используемых в масс-спектрометрии ЛОС. В первой главе проанализированы основные методы ионизации, используемые в масс-спектрометрии ЛОС, и рассмотрена возможность применения излучения лазерной плазмы для ионизации органических молекул.

1.1 Масс-спектрометрия летучих органических соединений

Масс-спектрометрия летучих органических соединений (ЛОС) развивается более трех десятилетий и используется в различных отраслях знания. Летучие органические соединения — это органические вещества, которые имеют высокое давление насыщенных паров при нормальных условиях. Они включают широкий класс органических соединений - углеводороды, альдегиды, спирты, кетоны, терпены и другие соединения. ЛОС несут ответственность за запахи и ароматы. Некоторые из них могут быть опасны для здоровья человека и окружающей среды.

Биогенные летучие органические соединения включают соединения, выделяемые растениями, животными или микроорганизмами. Растения выделяют ЛОС для защиты или привлечения внимания насекомых-опылителей. Летучие органические соединения, выделяемые животными, могут служить им как для общения и передачи информации, так и для защиты от врагов. Известно, что все виды позвоночных животных используют информацию, передаваемую запахами, для распознавания состояния других индивидов. Каждый индивид выделяет уникальный комплекс летучих органических соединений, представляющий собой комбинацию сотен или даже тысяч ЛОС. Они отражают и изменение метаболизма, например, вследствие патологических процессов, которое приводит к изменению запаха индивида. Поэтому комплексный анализ ЛОС, выделяемых организмом, относящийся к так называемым омиксным

технологиям, обладает большим потенциалом как для неинвазивной диагностики состояния организма в целом, так и для оценки риска конкретных заболеваний.

Основными источниками антропогенных летучих органических соединений являются: растворители, используемые в красках, лаках и чернилах, использование и производство ископаемого топлива, сжигание биомассы. В больших концентрациях эти вещества опасны и поэтому необходимы подходы для контроля. Таким образом, существует необходимость анализа летучих органических соединений, например для анализа воздуха на для поиска загрязнений, анализа летучих органических соединений, выделяемых живыми организмами для изучения процессов взаимодействия, метаболизма и диагностики заболеваний.

Существует несколько методов детектирования и анализа ЛОС. В первую очередь это методы аналитической химии [3]. Широко развиты спектральные методы, основанные на регистрации спектров поглощения или люминесценции [4], в том числе различные лазерные лидары [5]. Разработаны методы детектирования ЛОС, основанные на селективной сорбции соединений на поверхности пьезорезонаторов [6] и анализаторы «электронный нос» [7]. Однако наиболее совершенными методами являются методы анализа ЛОС с применением хроматографии и масс-спектрометрии.

Выделяют два основных подхода для детектирования и количественного определения – это газовая хроматография (ГХ) и масс-спектрометрия (МС).

Наиболее широко используемым инструментом для обнаружения и количественного определения газообразных ЛОС является газовая хромато-масс-спектрометрия или ГХ-МС с ионизацией электронным ударом. Этот превосходный метод используется в течение многих лет и позволяет достичь чувствительности до 0,1 pptv. Хотя это высокочувствительный и надежный метод, он страдает рядом недостатков, таких как время ГХ-анализа и ограничения на классы детектируемых ЛОС, связанные с типом применяемой колонки. Для полного разделения компонентов газовой смеси на капиллярной колонке требуется значительное время, по крайней мере, минуты, если не десятки минут. Если скорость анализа не являлась бы важным фактором, то ГХ-МС, вероятно, является лучшим доступным методом для измерения следовых уровней газообразных ЛОС. Однако требуются более быстрые методы, поэтому необходимо использование масс-спектрометрических методов без хроматографического разделения. В этом отношении масс-спектрометрия с ионизацией электронным ударом мало пригодна нескольким причинам [8]. Во-первых, электронный удар является неселективным ионизатором. Обычные неорганические составляющие атмосферы Земли, такие как N_2, O_2 и CO_2, имеют концентрацию на 6-12 порядков большую, чем определяемые ЛОС. Это подавляет отклик прибора в области низких масс. Во-вторых, многие ионы ЛОС подвергаются фрагментации после электронного

удара. В случае появления на входе масс-спектрометра смеси ЛОС может сделать идентификацию трудной, а часто и невозможной.

При заборе пробы из воздуха можно отсечь азот и кислород селективной мембраной. Полимерные мембраны использовались в течение нескольких десятилетий для селективного введения молекул в область источника ионов масс-спектрометра. Мембрана используется в качестве барьера между условиями вакуума масс-спектрометра и исследуемым образцом, который может быть в газообразном или жидком состоянии. Классическим примером является использование гидрофобной полимерной мембраны для отбора проб ЛОС, растворенных в водных растворах. Но мембраны селективны и не передают исходное соотношение компонентов ЛОС. Применение мембран не решает главную проблему – анализа смеси летучих органических соединений.

Решить проблему анализа смеси ЛОС без предварительного разделения можно с использованием на входе масс-спектрометра ионизатора, крайне слабо ионизирующего неорганические газы атмосферы и пары воды и обеспечивающего ионизацию ЛОС с преобладанием выхода молекулярных ионов с их минимальной фрагментацией. Такие методы принято называть «мягкими». Наиболее очевидный метод мягкой ионизации – фотоионизация при низком давлении газа, исключающем столкновения ионов. При правильном выборе спектра ионизирующего излучения можно обеспечить ионизацию как за счет однофотонного поглощения SPI [9] так и с применением резонансного многоступенчатого возбуждения REMPI [10]. Однако эти методы, обеспечивающие получение молекулярных ионов с минимальной фрагментацией, обладают принципиальным недостатком. Сечение однофотонной ионизации и сечение электронно-колебательных переходов сложных органических молекул мало (порядка 10^{-18} см^2), что требует использования для получения высокого выхода ионов источников излучения большой мощности.

Возможное решение заключается в использовании для получения ионов ЛОС процессов столкновений с другими ионами, создаваемыми в достаточно плотном газе источником ионизации. Для их создания используется вещество – сенсибилизатор [11], концентрация которого на несколько порядков превышает концентрацию детектируемых соединений. Это позволяет обеспечить эффективное использование энергии ионизатора за счет ионизации сенсибилизатора и обеспечить избыток ионов-реагентов для эффективной ионизации ЛОС. В настоящее время существует множество методов, реализующих эту идею.

1.2 Фотоионизация при атмосферном давлении

Фотоионизация органических соединений в газовой фазе при атмосферном давлении (ФИАД, Atmospheric pressure photoionization, APPI) - первым предложил и исследовал И.А. Ревельский с коллегами в 1983 году [12]. В отличие от фотоионизации при низком давлении, когда ионизируются непосредственно молекулы аналита, в методе ФИАД ультрафиолетовым излучением ионизируются молекулы специально введенного допанта с низким потенциалом ионизации. Ионы аналита получаются в результате цепочки обменных реакций, основной из которых является реакция передачи протона. В приборе газофазные молекулы аналита и допанта, поступают в камеру в потоке буферного газа и взаимодействуют с испускаемыми разрядной лампой фотонами, производя ионы. Интерес к методу ФИАД обусловлен тем, что эффективен для ионизации неполярных соединений, которые не ионизируются электроспреем или ХИАД, таких как полициклические ароматические углеводороды. Для совершенствования процесса фотоионизации в методе ФИАД часто используется допант.

С ФИАД использовались различные газоразрядные лампы. Наиболее используемой является криптоновая, генерирующая две линии с энергией фотонов 10,0 и 10,6 эВ. Обычно используемые УФ-лампы генерируют фотоны с более высокой энергией, чем потенциалы ионизации допантов и аналитов, но более низкими, чем у буферного газа и используемых растворителей. Это позволяет селективно производить ионы из аналитов без ионизации растворителя и буферного газа, что значительно снижает фоновый шум. Как следует из данных, приведенных на Рисунке 1, наиболее подходящей является криптоновая газоразрядная лампа, излучающая фотоны с энергиями 10,0 и 10,6 эВ. Действительно, большинство аналитов имеют энергию ионизации (IE) от 7 до 10 эВ.

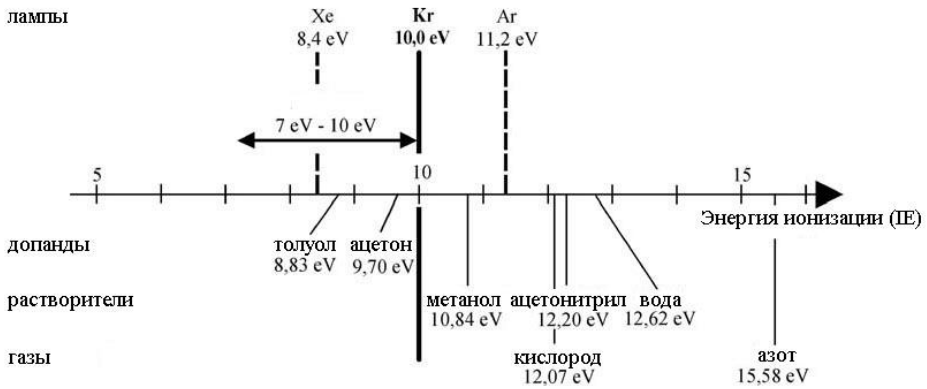

Рисунок 1 - Энергия ионизации молекул, часто присутствующих в источниках APPI (растворители, легирующие соединения, компоненты воздуха [13]

С другой стороны, компоненты воздуха (азот и кислород) и большинство обычных растворителей (метанол, вода, ацетонитрил и т. д.) имеют более высокий потенциал ионизации. Однако прямая ионизация аналита, как это отмечалось выше, характеризуется низкой эффективностью из-за низкого сечения ионизации.

Было показано, что допант в относительно высоких концентрациях по сравнению с аналитом позволяет повысить эффективность ионизации от 10 до 100 раз [14], из чего следует, что процесс инициируется фотоионизацией допанта. Допант должен иметь низкий потенциал ионизации и действовать как промежуточное соединение для ионизации молекул образца. Наиболее часто используемые допанты - толуол и ацетон, потенциалы ионизации которых приведены на Рисунке 1.

Ионизация в ФИАД происходит двумя путями: прямым и непрямым. Аналит в прямом ФИАД поглощает энергию фотонов [15], образуя катион-радикал ($M^{+\bullet}$) который реагирует с молекулой растворителя (S) с образованием $[M + H]^+$ иона путем отрыва атома водорода, следующим образом:

$M + h\nu \rightarrow M^{+\bullet} + e^-$

$M^{+\bullet} + S \rightarrow [M + H]^+ + S[-H]$

Для веществ с высокими значениями энергии ионизации применим непрямой путь. Этот тип фотоионизации включает использование допанта (D), который представляет собой растворитель с более низким потенциалом ионизации, чем энергия испускаемого фотона (например, ацетон и толуол с IE = 9,7 и 8,83, соответственно), который действует как промежуточное звено между фотонами и аналитами. Допант поглощает энергию фотонов, образуя катион-радикал ($D^{+\bullet}$), который, в свою очередь, ионизирует аналит (M), образуя ион путем перезарядки или путем передачи протона в зависимости от энергии ионизации или сродства к протону как аналита, так и растворителя:

$D + h\nu \rightarrow D^{+\bullet} + e^-$

$D^{+\bullet} + M \rightarrow D + M^{+\bullet}$

$D^{+\bullet} + S \rightarrow [D - H] + [S + H]^+$, и далее $[S + H]^+ + M \rightarrow S + [M + H]^+$

Таким образом, помимо прямой фотоионизации, аналиты в ФИАД ионизируются либо за счет перезарядки, либо за счет переноса протона. Прямая ионизация и процессы перезарядки позволяют ионизировать неполярные соединения, которые менее эффективно ионизируются в химической ионизации при атмосферном давлении и ионизацией электроспреем [13].

1.3 Прямой анализ в режиме реального времени

Вторым эффективным методом ионизации органических соединений при столкновительных процессах в плотном газе является ионизация Пеннинга [16]. Ионы образуются в результате столкновения нейтральной молекулы с атомом, находящемся в метастабильном состоянии. При этом энергия метастабильного состояния атома должна превышать потенциал ионизации молекулы. Так как это трехчастичный процесс:

$$Г^* + M = M^{+\bullet} + Г + e^-,$$

где Г* – атом или молекула газа в возбужденном состоянии, M – молекула аналита, $M^{+\bullet}$ – молекулярный ион-радикал, он оказывается эффективным вне зависимости от разности энергий метастабильного состояния атома и потенциала ионизации молекулы. Это явление используется в методе прямого анализа в режиме реального времени (Direct analysis in real time, DART) – ионизация низкомолекулярных соединений в потоке газа с поверхности твердых и жидких объектов. Метод был разработан в 2002 годах Коди, Ларами и Дарстом, в 2003 получен патент США и опубликована статья в 2005 [17,18].

С помощью DART масс-спектрометрии проводят быстрый и бесконтактный анализ различных образцов [11]. Этот метод позволяет напрямую детектировать химические вещества на поверхностях, в жидкостях и газах без необходимости подготовки проб. Метод имеет недостатки, в частности ограниченный класс определяемых соединений, и не обеспечивают необходимую «широкополосность» анализа.

Технически метод реализуется следующим образом: в ионный источник вводится газ, (гелий или азот), и создается тлеющий разряд. В результате образуются ионы, электроны и нейтральные атомы в метастабильном состоянии. Полученная плазма проходит через серию электродов, предназначенных для удаления любых заряженных частиц, оставляя только поток нейтральных частиц, содержащие метастабильные атомы, которые затем взаимодействуют с органическими молекулами.

Возможны несколько механизмов, участвующих в образовании ионов, в зависимости от свойств анализируемой молекулы, таких как потенциал ионизации, энергия сродства к протону, полярность и природы используемого газа.

Считается, что механизм ионизации ДАРТ включает девять газофазных реакций. Реакции приведены в Таблице 1:

Таблица 1 Газофазные реакции составляющие механизм ионизации DART [19]

Номер	Уравнение реакции	Условия протекания
1	$He^{*} + H_2O \rightarrow He + H_2O^{+\bullet} + e^{-}$	$E_m(He)>E_i(H_2O)$
2	$H_2O^{+\bullet} + (H_2O)_m \rightarrow HO^{+\bullet} + [(H_2O)_m + H]^{+}$	$A((H_2O)_m)>A(HO^{\bullet})$
3	$He^{*} + S \rightarrow He + S^{+\bullet} + e^{-}$	$E_m(He) > E_i(S)$
4	$S^{+\bullet} + S_n \rightarrow [S – H]^{\bullet} + [S_n + H]^{+}$	$A(S_n)>A([S\text{-}H]^{\bullet})$
5	$[(H_2O)_m+H]^{+}+ S_n \rightarrow (H_2O)_m +[S_n + H]+$	$A(S_n)>A((H_2O)_m)$
6	$[S_n+H]^{+}+M \rightarrow S_n + [M + H]^{+}$	$A(M)>A(S_n)>A([S\text{-}H]^{\bullet})$
7	$S^{+\bullet} + M \rightarrow [S – H]^{\bullet} + [M + H]^{+}$	$A(M)> A([S\text{-}H]^{\bullet})>A(S_n)$
8	$S^{+\bullet} + M \rightarrow S + M^{+\bullet}$	$A([S\text{-}H]^{\bullet})>A(S_n)$ и $E_i(S) > E_i(M)$
9	$[(H_2O)_m+H]^{+}+ M \rightarrow (H_2O)_m + [M + H]+$	Протекает при условии, что вклад конкурирующих реакций незначителен

В Таблице приняты следующие обозначения: $E_m(He)$ – энергия атома гелия в метастабильном состоянии (19,8 эВ), m = 1, 2 или 3, n = 1 или 2, E_i - энергия ионизации, A – сродство к протону, S – молекула матрицы (растворителя)

Механизм десорбции органических соединений с поверхностей этим методом до конца не изучен. Одним из этих механизмов является термодесорбция, поскольку анализ проводится в потоке нагретого газа, что способствует десорбции некоторых аналитов. Однако успешный анализ аналитов с низким давлением пара с помощью DART указывает на то, что происходят и другие процессы.

1.4 Химическая ионизация при атмосферном давлении

Для создания ионов органических соединений в газовой фазе можно использовать различные разряды, создаваемые постоянным, импульсным или радиочастотным напряжением как в газе, так и на различных поверхностях [20]. В этом случае образование первичных ионов обусловлено несколькими механизмами, включающими ионизацию Пеннинга, фотоионизацию, ионизацию электронным ударом. Ионы аналитов получаются в результате цепочки обменных реакций, главной из которых является реакция передачи протона.

В методе Химическая ионизация при атмосферном давлении (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI, ХИАД) молекулы аналита и сенсибилизатора (растворителя) подаются в потоке буферного газа в область коронного разряда, где происходит ионизация. Первый источник химической ионизации атмосферного давлении был разработан группой [21] Хорнинга и Кэрролла в 1970-х годах в Медицинском колледже Бейлора (Хьюстон, Техас).

В APCI растворитель (S) ионизируется в коронном разряде с образованием ионов-реагентов, которые, в свою очередь, ионизируют аналит (M) путем перезарядки или переноса протона. следующим образом [13]:

$S + e^- \rightarrow S^+ + 2e^-$

$S^+ + M \rightarrow S + M^+$

$S^+ + S \rightarrow [S + H]^+ + S[-H]$ далее $[S + H]^+ + M \rightarrow S + [M + H]^+$

В APCI пары растворителя ионизируются коронным разрядом с образованием ионов-реагентов. Метод в основном применяется к полярным и относительно неполярным соединениям с молекулярной массой примерно до 1500.

Областью применения APCI является анализ лекарств, неполярных липидов, природных соединений, пестицидов и различных органических соединений, но он имеет ограниченное применение при анализе биополимеров, металлоорганических соединений [22].

1.5 Вторичная ионизация электрораспылением

В 1984 году в СССР (Галль с сотрудниками [23]), а затем в США (Фенн [24]) был разработан метод ионизации органических соединений путем распыления раствора в сильном электрическом поле. Физические основы метода были разработаны ранее (предел Рэлея [25] в 1882, работа Зеленого [26] , в которой он сфотографировал конусную струю глицерина в сильном электрическом поле в 1914, конус Тейлора в 1964 году [27]). Метод электрораспыления стал основным методом в масс-спектрометрии сложных органических соединений при анализе растворов соединений. Однако вскоре было установлено, что при внесении в электроспрей паров органических соединений в виде потока газа также удается получить ионы органических соединений.

Вторичная ионизация электрораспылением (Secondary electro-spray ionization, SESI-MS), метод ионизации, основанный на взаимодействии ионов реагента электроспрея с летучими органическими соединениями [28]. Впервые тот факт, что в контакте со струей электрораспыления были эффективно ионизированы следовые концентрации газов, был замечен Фенном и его коллегами [29]. В 2000 году эта проблема была переосмыслена как решение, в котором Хилл и его коллеги использовали электрораспыление для ионизации молекул в газовой фазе (MS) [28,30].

Механизм ионизации SESI обсуждается в нескольких работах и первоначально рассматривался в двух вариантах – за счет взаимодействия паров аналита с каплями с заряженными растворителя или за счет более простых газофазных ион-молекулярных взаимодействий. Сегодня дискуссия о механизме ионизации закрыта [31], поскольку современные источники ионизации SESI работают около точки кипения растворителя, капли растворителя испаряются очень быстро, а реагенты достигают термодинамического равновесия в непосредственной близости от электрораспыления, в результате чего они в основном состоят из кластеров протонированных молекул воды или растворителя [32].

В 2007 году почти одновременные опубликованы работы Ренато Зеноби и Пабло Синуэса, в которых они впервые применили SESI к анализу дыхания, положив начало плодотворной области исследований [33,34]. Главная особенность SESI заключается в том, что метод позволяет обнаружить незначительные концентрации летучих органических соединений с молекулярными массами более чем 700 Да.

1.6 Масс-спектрометрия выделенных ионов в потоке

Масс-спектрометрия выделенных ионов в потоке (МСВИП, Selected-ion flow-tube mass spectrometry, SIFT-MS) - это метод количественного определения летучих органических соединений, основанный на реакции предварительно выделенного иона-предшественника (как правило, H_3O^+, NO^+, O_2^+) с молекулами следовых количеств аналитов в потоке гелия в трубе дрейфа (в английском «flow tube»). SIFT-MS – это развитие технологии SIFT [35], которая была впервые описана в 1976 году Адамсом и Смитом и стала стандартным методом изучения ионно-молекулярных реакций в газовой фазе. Использование SIFT-MS для обнаружения летучих органических соединений было впервые предложено Смитом и Шпанелем [36]. Возможность очень быстрого переключения с одного иона-реагента на другой позволяет получать комплементарные спектры и, таким образом, расширять круг анализируемых соединений.

Характеристичные ионы-продукты образуются из молекул аналита, входящих в реакцию с созданными в источнике ионами, скорости которых известны из кинетических измерений. Коэффициенты скорости реакции рассчитываются по уравнению 1. Не сложно учесть также и ситуации, когда образуется несколько ионов-продуктов.

Следует подчеркнуть, что уравнение 1 справедливо, когда речь идет о незначительных уровнях аналита в анализируемой воздушной смеси, и расход первичных ионов практически незаметен.

$$[MH^+]_t = k[H_3O^+][M]tD_e, \qquad (1)$$

где t – время реакции, D_e – поправка на диффузию, k – константа скорости реакции.

Поправку на диффузию достаточно легко вычислить, причем эта величина равна 1, если диффузионные потери ионов-предшественников и ионов-продуктов идентичны. Чем больше масса иона-продукта по сравнению с массой иона-предшественника, тем сильнее D_e отличается от единицы. Таким образом, согласно уравнению 1, интенсивность иона-продукта прямо пропорциональна числу молекул внесенного аналита. Следует еще раз подчеркнуть, что аналит должен быть в следовых количествах. В противном случае метод не может использоваться для анализа мультикомпонентных систем (например, для анализа выдоха), когда не ясно, каким именно компонентом смеси обусловлена потеря первичных ионов-реагентов и какие возможны вторичные процессы.

В качестве недостатка следует отметить, что, поскольку метод основан на реакциях ионов-реагентов (H_3O^+, NO^+, $O_2^{+\cdot}$) с молекулами летучих соединений в длинной трубе дрейфа, в спектре часто наблюдаются интенсивные пики неустановленных ионов. Очень большие потери ионов реагентов при выделении их в квадрупольном масс-спектрометре и инжекции из области вакуумного квадруполя в дрейф-трубу с газом.

1.7 Масс-спектрометрия с реакцией переноса протона

Метод масс-спектрометрии ЛОС на основе реакции переноса протона (РПП, Proton Transfer Reaction, PTR-MS) был разработан в середине 1990-х Линдингером и его сотрудниками в Университете Инсбрука в Австрии [37,38]. В этом методе используется реакция переноса протона с ионов гидроксония для ионизации летучих органических соединений. Ионы гидроксония создаются разрядом в полом катоде, находящемся в отдельной камере, из водяного пара. Далее они подаются в дрейфовую трубу («drift tube») и реагируют с аналитами. Дрейфовая труба представляет собой последовательность нескольких металлических колец, разделенных тефлоновыми прокладками для поддержания требуемого давления и электроизоляции. Кольца связаны с цепью сопротивлений для разделения общего напряжения дрейфа на участки с равномерно повышающимся напряжением и созданием однородного электрического поля. Это поле заставляет ионы двигаться вдоль трубы, взаимодействуя с соответствующими компонентами газовой смеси. Ускорение ионов за счет поля уменьшается столкновениями с молекулами газа. В результате ионы в области дрейфа приобретают стационарную скорость движения.

Процесс переноса протона происходит в дрейфовой трубе, который увеличивает кинетическую энергию иона и эффективно ограничивает образование кластерных ионов с большим количеством молекул воды в окружающем воздухе. Это упрощает как процесс переноса протона, так и интерпретацию масс-спектров. Экзотермичность реакций переноса протона достаточно мала, поэтому степень фрагментации иона продукта ограничена, а массы ионов

продукта могут использоваться в качестве уникальных идентификаторов для многих важных летучих органических соединений.

Важно отметить два отличия между РПП масс-спектрометрией от аналогичных методов, например, SIFT. Первое - это отсутствие необходимости установки ионного фильтра масс между источником и областью дрейфа, который используется в SIFT для отбора определенных ионов перед реакцией с аналитом [8]. ОН был заменен на источник разряда с полым катодом, который может генерировать H_3O^+ с высокой эффективностью (> 99,5%). Небольшое количество примесных ионов $O_2^{+\cdot}$ и NO^+, образующихся в ионном потоке, не сказываются существенно на результатах анализа. Вторым нововведением была замена бесполевой трубки относительно короткой дрейфовой трубкой. В бесполевой трубке ионы переносятся газом-носителем, тогда как в дрейфовой трубке электрическое поле является основным средством переноса ионов. Вместо использования газа-носителя для переноса ионов по трубке, проба анализируемого воздуха вводится непосредственно в дрейфовую трубку, и инертные компоненты воздуха (N_2, O_2 и др.) служат термализаторами. В SIFT-MS разбавление потока анализируемого газа избыточным гелием необходимо для минимизации образования ионно-молекулярных кластеров, особенно тех, которые образуются из остаточного водяного пара. Однако в PTR-MS значительно более высокие энергии столкновения ионов с молекулами при использовании дрейфовой трубки означают, что образование $H_3O+(H_2O)_n$ и других кластерных ионов может быть уменьшено до незначительного уровня без разбавления образца. Это может происходить за счет более короткого времени реакции и некоторой дополнительной фрагментации ионов продукта по сравнению с SIFT-MS.

Реакция иона гидроксония с молекулой аналита приводит к его протонированию по реакции:

$$M + H_3O^+ \rightarrow MH^+ + H_2O. \qquad (2)$$

Концентрация ионов H_3O^+ после прохождения области дрейфа может быть выражена как:

$$[H_3O^+] = [H_3O^+]_0 \exp(-k[M]t), \qquad (3)$$

где $[[H_3O^+]_0$ — количество ионов H_3O^+ в отсутствие M, k – константа скорости реакции H_3O^+ с аналитом, а t — время реакции.

Концентрация ионов MH^+, образующихся по реакции протонирования, может быть выражена уравнением:

$$[MH^+] = [H_3O^+]_0[1 — \exp(-k[M]t)] \approx [H_3O^+]_0[M]kt. \qquad (4)$$

Эта форма уравнения и справедлива лишь в том случае, если незначительная часть исходных ионов H_3O^+ реагирует в области дрейфа. Следовательно, для проведения

количественного определения необходим большой избыток ионов H_3O^+, причем концентрация ионов MH^+ в этом случае будет линейно расти с концентрацией M в анализируемом воздухе.

Интенсивность зарегистрированных сигналов ионов H_3O^+ и MH^+ пропорциональна концентрации этих частиц. Отсюда может быть получена абсолютная концентрация аналита M в пробе. Масс-спектрометр дает информацию о значениях интенсивности пиков ионов H_3O^+ и MH^+, t — время, за которое ионы H_3O^+ пролетают область дрейфа, а k — константа скорости реакции H_3O^+ с аналитом:

$$[M] = [MH^+]/[H_3O^+]kt \qquad (5)$$

Недостаток РПП-МС заключается в ограниченном наборе классов соединений, который можно изучать этим методом. Поскольку ионом реагентом является H_3O^+, ионизируются лишь молекулы с величиной сродства к протону больше, чем у воды. Этот факт является преимуществом для проведения анализов органических загрязнений воздуха, поскольку ионизируются все основные соединения этого типа, а все неорганические газы атмосферы - нет. В результате атмосферный воздух может служить буферным газом, что существенно упрощает анализ. В качестве проблемных аспектов РПП можно отметить негативное влияние влажности воздуха и высокого содержания двуокиси углерода.

Использование источника с возможностью переключения газов (вода/аммиак) позволяет делать определенные выводы по качественному и количественному составу воздушных проб благодаря разности в величинах сродства к протону этих соединений. Ион H_3O^+ протонирует молекулы с величиной сродства к протону больше 691 кДж/моль, а ион NH_4^+ — только молекулы с величиной протонного сродства больше 854 кДж/моль. Во втором случае селективность ионизации возрастает, а избыточная энергия протонированных молекул аналитов уменьшается, то есть подавляется усложняющая спектры PTR фрагментация.

Необходимо отметить, что SIFT и PTR, в отличии от всех методов, рассматриваемых в этой главе, не являются атмосферными методами, так как образование ионов происходит при давлении 1 торр. Тем не менее на сегодняшний день, это одни из основных инструментов анализа летучих органических соединений в следовых количествах.

1.8 Плазма как ионизатор для окружающего газа.

Фотоионизация органических соединений в газовой фазе при атмосферном давлении успешно используется в жидкостной и газовой хромато-масс-спектрометрии [14]. Для ионизации используется газоразрядная лампа, отделенная от области ионизации оптически окном. Энергия фотонов ограничена прозрачностью материала и не превышает 10,6 эВ.

Как было отмечено выше, фотоионизация является эффективным методом получения ионов при атмосферном давлении. Однако ограничения спектра ламп оптическими элементами до

энергии кванта около 10.6 эВ не позволяют ионизовать молекулы воды, которые могут являться идеальными донорами протона в силу малого сродства к протону радикала OH (485 кДж/моль). В работе [1] было предложено использовать излучение лазерной плазмы в качестве ионизатора при атмосферном давлении.

Наиболее важными параметрами плазмы, как источника жесткого УФ излучения, ионизирующего органические молекулы, являются спектр излучения, связанный с температурой плазмы, и время существования горячей плазмы [39] .

Излучение плазмы, создаваемой наносекундными и субнаносекундными лазерными импульсами, является нестационарным, и во время процесса разлета и излучения плазмы в окружающую среду (газ или вакуум) спектр оптического излучения плазмы изменяется от сплошного, не содержащего выделенных спектральных линий на начальном этапе разлета, до классического эмиссионного спектра с характеристическими линиями излучающего вещества на поздних стадиях [40–42].

Так как спектральный диапазон оптического излучения плазмы может захватывать и область вакуумного ультрафиолетового излучения, это излучение может быть использовано в масс-спектрометрии для ионизации органических соединений в газовой фазе [1]. В этом случае важную роль играет жесткое ультрафиолетовое (УФ) излучение на начальной стадии существования лазерно-индуцированной плазмы, кванты которого, обладая большой энергией, обеспечивают ионизацию любых органических соединений и молекул воды [1,43].

Поздние стадии разлета плазмы характеризуются преобладанием в излучении линейчатого спектра, связанного с эмиссией возбужденных атомов и ионов, из которых состоит материал твердой мишени [42,44].

1.9 Ионизация излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении

В 2013 году сотрудниками лаборатории Лазерной Диагностики Института общей физики Российской Академии Наук была опубликована работа, в которой было продемонстрирован новый метод ионизации ЛОС, основанный на использовании жесткого импульсного ультрафиолетового излучения лазерной плазмы при атмосферном давлении. Предложенный и разработанный авторами метод ионизации был назван Atmospheric Pressure Laser Plasma Ionization (APLPI) [1].

В работе ионизация ЛОС осуществлялась в камере в воздухе и аргоне при атмосферном давлении, в которой находилась металлическая мишень, облучаемая импульсным лазерным излучением. При плотности энергии импульса на поверхности металла 35 Дж/см^2 образовывалась плазма, излучение которой и было использовано для ионизации. В отличие от фотоионизации ЛОС излучением лампы, рассмотренной выше, плазменный источник не имеет

оптических элементов, ограничивающий спектр излучения. В работе было показано, что основным каналом ионизации является реакция передачи протона, а источником протона является ионизованная молекула воды.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что излучение лазерной плазмы обеспечивает однофотонную ионизацию молекул воды, имеющих потенциал ионизации 12.6 эВ [45]. Можно предположить, что образующиеся первичные молекулярные ионы затем вступают в ион-молекулярные реакции с молекулами воды с образованием ионов гидроксония H_3O^+ (энергия сродства к протону 691 кДж/моль [46]), которые, в свою очередь, являются эффективными донорами протонов, обеспечивающими «мягкую» ионизацию органических и биоорганических соединений. Возможна и прямая передача протона от иона молекулы воды H_2O^+, который является более эффективным донором протона, чем H_3O^+, из-за меньшей энергии сродства к протону (593 кДж/моль [46]).

Такой канал ионизации – не единственно возможный, о чем свидетельствует масс-спектр на Рисунке 2, полученный при напуске в камеру образца аргона. В этом масс-спектре помимо пиков ионов Ar^+ и O_2^+, образующихся в результате прямой фотоионизации (потенциалы ионизации 15.75 и 14.01 эВ), наблюдается интенсивный пик протонированного аргона ArH^+ с m/z = 41, а также пики протонированных молекул азота N_2H^+ с m/z = 29 и кислорода O_2H^+ с m/z = 33. Энергии сродства к протону аргона, кислорода и азота составляют соответственно 369, 421 и 494 кДж/моль [46]. Это указывает на то, что вторым каналом протонирования может являться присоединение протонов, образующихся в условиях воздействия излучения лазерной плазмы на присутствующих в камере образца пары воды. Следует отметить, что введение в камеру образца паров тяжелой воды приводит к образованию дейтерированных пиков аргона, кислорода и азота.

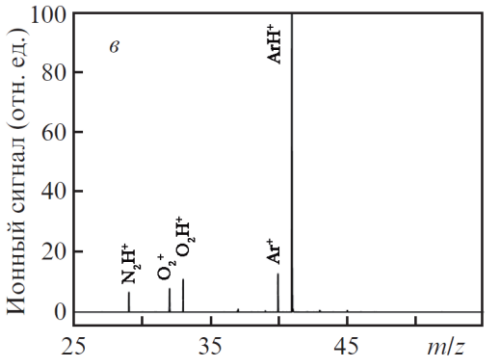

Рисунок 2 - Масс-спектр, полученный при напуске аргона в камеру образца

В работе было продемонстрировано, что метод, основанный на сочетании лазерной абляции с ионизацией ее продуктов излучением лазерной плазмы, который позволяет анализировать газообразные, жидкие и твердые вещества при атмосферном давлении без пробоподготовки.

1.10 Плазма оптического пробоя в газах как ионизатор органических соединений (ALADIN)

Развитием метода APLPI стала работа, в которой плазма создавалась более мощным лазерным излучением без использования металлической мишени непосредственно в газе перед заборником масс-спектрометра. В 2016 году Андреас Бирштедт и Йенс Ридель опубликовали работу [47], где в качестве источника ионов для масс-спектрометрии предлагается использовать лазерную плазму, возникающую при оптическом пробое в газовых средах. Авторы метода назвали его «Airborne laser-spark for ambient desorption/ionization» (ALADIN). В сравнении с методом APLPI способ создания плазмы в методе ионизации ALADIN менее эффективен в силу более высокого порога ее возникновения и, соответственно, необходимости использования более мощных лазеров. В работе был использован лазер с частотой следования импульсов 1–500 кГц, максимальная энергия в импульсе: 300 мкДж, длительность импульса: <10 нс, средняя мощность: 12 Вт при 50 кГц), тогда как в работе [1] средняя мощность лазера составила всего 75 мВт при частоте 300 Гц.

Бирштедт и коллеги предполагают три различных пути ионизации молекул в методе ALADIN. Во-первых, в присутствии молекул с более высоким сродством к протону протонированные кластеры воды могут вступать в эффективную реакцию переноса протона с основными аналитами газовой фазы с образованием протонированного молекулярного иона $[M + H]^+$. Второй путь объясняется наличием аммиака, который образует аммонизированный ион $[M + NH_4]^+$. Третий путь, по мнению авторов, возможнон образование ионов неполярных молекул, за счет передачи заряда, например, от иона O_2^+.

Для большинства исследованных соединений было обнаружено, что, так же, как и работе [1], предпочтительным каналом ионизации является образование протонированных соединений по сравнению с образованием аддуктов аммония. В полученных масс-спектрах регистрировались: одиночные ионы $[M + H]^+$ и $[M + NH_4]^+$, димеризация $[2M + H]^+$ и $[2M + NH_4]^+$, тримеризация $[3M + H]^+$ и $[3M + NH_4]^+$ и образование тетрамеров $[4M + H]^+$ и $[4M + NH_4]^+$.

В опубликованной группой в 2017 году работе были рассмотрены характеристики источника [43]. Основываясь на результатах оптической эмиссионной спектроскопии и масс-спектрах газовых сред, авторы делают выводы, что генерация аммиака происходит в ионном источнике из окружающих N_2 и H_2O. В работе рассматривают два механизма образования наблюдаемого $M^{\bullet+}$, а именно электронный удар и фотоионизацию, которые возможны из-за высокой плотности свободных электронов и наблюдаемой яркости плазмы. Известно, что лазерно-индуцированная плазма излучает свет в вакуумно-ультрафиолетовой области, т. е. с

достаточно короткой длиной волны для однофотонной ионизации. На Рисунке 3, Рисунке 4 и Рисунке 5 показаны масс-спектры окружающих ионный источник газовых сред, которые приведены работе. Газовые среды создаются потоком газа (сжатый воздух, азот (99,999) и аргон (99,999)) со скоростью потока 0,5 л/мин, что соответствует ~ 8 см^3/с.

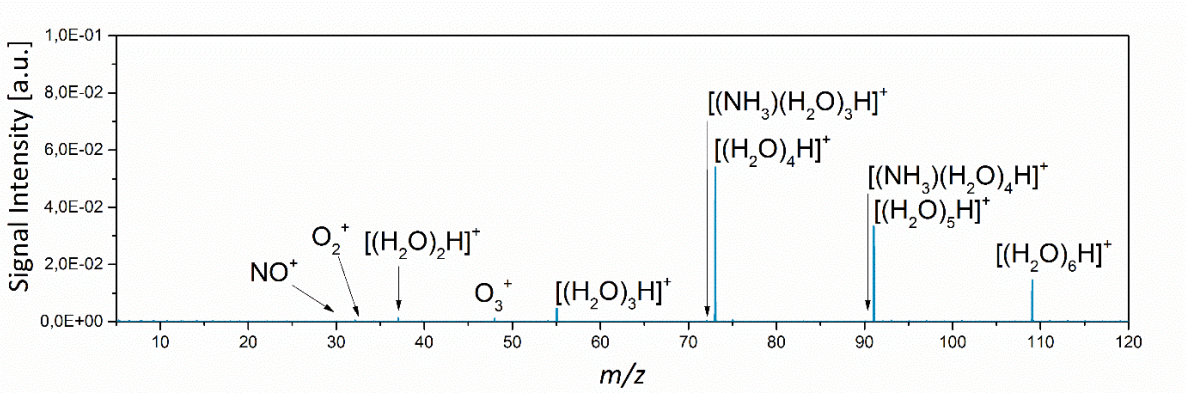

Рисунок 3 - Масс-спектр газовой среды при подаче в область ионизации воздуха [43]

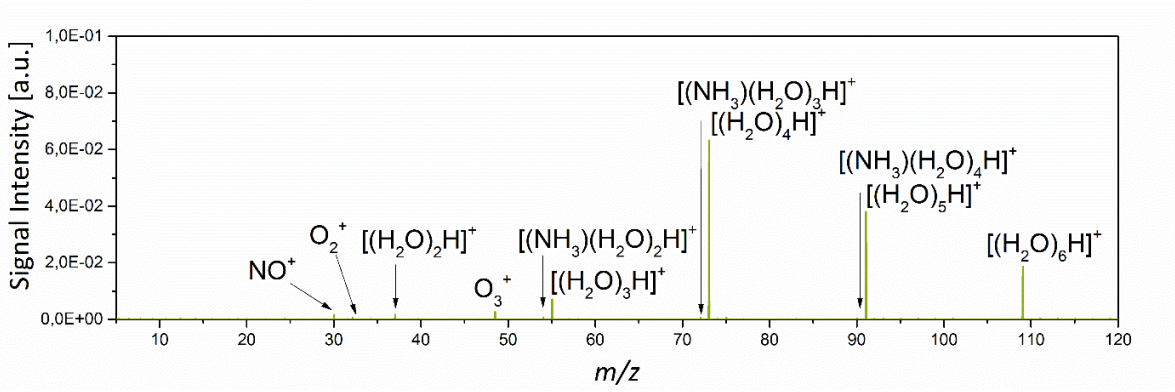

Рисунок 4 - Масс-спектр газовой среды при подаче в область ионизации азота [43]

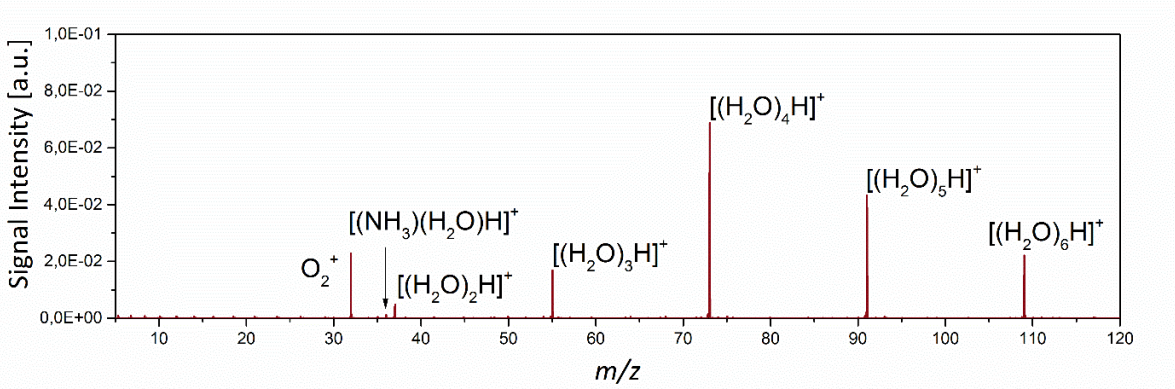

Рисунок 5 - Масс-спектр газовой среды при подаче в область ионизации аргона [43]

В работах Бирштедта отсутствует сравнение эффективности ионизации в различных газах. Предположительно, это связано с работой без ионизационной камеры и, в связи с этим невозможностью создать однородную газовую среду в ионном источнике.

1.11 Лазерная плазма

Лазерная плазма – это плазма, образующаяся при воздействии мощного лазерного излучения на газообразное или конденсированное вещество. В данной работе будет использоваться плазма, возникающая на поверхности металла при воздействии субнаносекундных импульсов излучения. Лазерной плазмой принято называть плазму оптического пробоя, возникающего при фокусировке импульсного лазерного излучения на поверхности образца (или в объёме газа).

Лазерная плазма возникает при воздействии лазерного излучения на среду, когда плотность потока излучения превышает пороговое значение, зависящее от длины волны лазерного излучения и, в случае металлической мишени, от коэффициента отражения излучения, температуры плавления металла и других параметров среды. Различают две стадии существования лазерной плазмы [48,49] :

1. Стадия формирования и нагрева под действием лазерного излучения. В течении лазерного импульса происходит интенсивное испарение мишени с последующим оптическим пробоем в парах испаренного вещества и дальнейший нагрев плазмы.
2. Стадия излучения и разлета плазмы, формирования ионных потоков.

Начальная стадия образования лазерной плазмы связана с оптическим пробоем, возникновение которого объясняется двумя механизмами: ускорением затравочных электронов в поле лазерного излучения до энергий, приводящих к ионизации электронным ударом атомов металла; лавинное нарастание плотности электронов и ионов с последующим формированием плотного плазменного сгустка над поверхностью мишени. Характерные величины плотности потока лазерного излучения с длиной волны 1.06 мкм для пробоя газов при атмосферном давлении находятся на уровне 10^{11} Вт/см^2 [20] и выше, в то время как оптический пробой газа вблизи поверхности твердых мишеней при воздействии на них лазерного излучения начинается при более низких характерных величинах плотности потока лазерного излучения от 10^8-10^9 Вт/см^2 [50].

Длина волны большинства коммерчески доступных лазерных систем находятся в области видимого и ближнего инфракрасного (ИК) излучения (~500–1200 нм) и, вследствие этого, энергия излучаемых ими фотонов недостаточна для линейного поглощения в большинстве газов ($\hbar\omega < E_g$, где E_g – ширина запрещенной зоны вещества). В случае же фокусировки и коротких длительностей импульсов в перетяжке может достигаться высокая интенсивность лазерного излучения (от 10^8 Вт/см^2 и выше). Благодаря этому лазеры ультракоротких импульсов позволяют реализовать режим нелинейного поглощения, в котором происходит локализованная ионизация материала в области максимальной интенсивности излучения.

Для достижения высокой интенсивности излучения, необходимой для протекания нелинейных процессов, необходимых для образования лазерной плазмы, требуется фокусировка лазерных импульсов. В отсутствии сферической аберрации и нелинейных эффектов пространственное распределение интенсивности гауссового пучка может быть описано в параксиальном приближении формулой:

$$I(\rho, z) = \left(\frac{w_0}{w(z)}\right)^2 exp\left(-\frac{2\rho^2}{w^2(z)}\right), \quad (6)$$

где $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$ – радиальная координата, а z – расстояние от перетяжки пучка, а радиус фокального пятна w_0 (характерная величина на уровне от единиц до десятков микрометров), вычисляемого по формуле:

$$w_0 = \frac{M^2 \lambda}{\pi\, NA}, \quad (7)$$

где M^2 – параметр качества лазерного пучка [51,52], NA – числовая апертура фокусирующей оптики, а λ – длина волны излучения.

Начальная ионизация, необходимая для появления начальной плотности электронов под действием сфокусированных лазерных импульсов высокой мощности в зависимости от длины волны, интенсивности лазерного излучения и параметров среды может быть обеспечена двумя эффектами: многофотонной ионизацией и туннельной ионизацией, как это было показано в работах Келдыша [53].

Для высоких по интенсивности лазерных полей и относительно длинноволнового лазерного излучения преобладает нелинейная фотоионизация, которая происходит за счет процесса туннелирования. Если напряженность электрического поля в области фокусировки будет сравнима или будет превышать внутриатомное поле в веществе, то кулоновский потенциальный барьер для связанного электрона может быть существенно снижен, и электрон сможет через него туннелировать, став свободным, как показано на Рисунке 6а.

Для более коротких длин волн лазерного излучения нелинейная ионизация описывается в терминах одновременного поглощения нескольких фотонов электроном, как показано на Рисунке 6в. При этом необходимое для ионизации количество одновременно поглощенных фотонов M определяется шириной запрещённой зоны в материале:

$$M * \hbar\omega > E_g \quad (8)$$

В этом режиме плотность свободных электронов N_e зависит от интенсивности лазерного излучения по закону:

$$\left(\frac{dN_e}{dt}\right)_{MPI} = \sigma_M I^M, \quad (9)$$

где σ_M - коэффициент многофотонного поглощения для M фотонов.

Граница между указанными режимами нелинейной ионизации была введена в работе Келдыша [53], а количественный параметр этого перехода γ (параметр Келдыша) определяется как

$$\gamma = \frac{\omega}{e}\sqrt{\frac{mcn\varepsilon_0 E_g}{I}}, \qquad (10)$$

где ω несущая частота лазерного излучения, I – интенсивность в фокусе, m и e – приведенная масса и заряд электрона, c – скорость света в вакууме, n – показатель преломления материала, E_g – ширина запрещенной зоны материала и ε_0 – абсолютная диэлектрическая проницаемость. В случае значения параметра Келдыша более 1.5 фотоионизация происходит, в основном, за счет многофотонного процесса, в то время как при значениях менее 1.5 – за счет процесса туннелирования. При значениях $\gamma \approx 1.5$ ионизация происходит за счет комбинации туннельной и многофотонной ионизаций, как показано на Рисунке 6б.

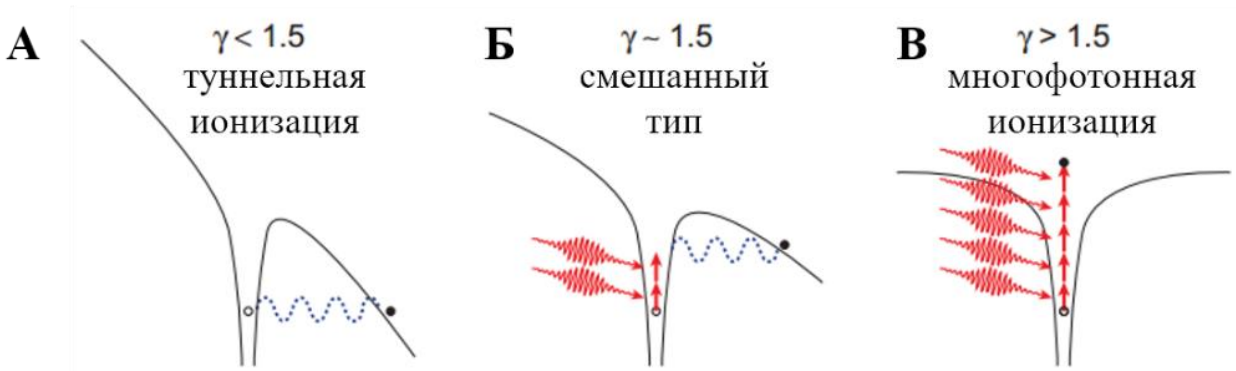

Рисунок 6 - Процесс фотоионизации для различных значений параметра Келдыша: (а) туннельная ионизация, (б) смешанный тип и (в) многофотонная ионизация.*[54]*

Для исследуемых в работе газов (аргон, азот, воздух) ширина запрещенной зоны равна варьируется от 11.9 эВ до 15.8 эВ [55]. Следовательно, лазерному излучению на длине волны 1.06 мкм необходимо от 11 до 14 фотонов для многофотонной ионизации. Для реализации этого процесса требуется сильная фокусировка лазерных импульсов, обеспечивающая плотность мощности более 100 ГВт/см^2 при атмосферном давлении и использовании наносекундных лазерных импульсов на длине волны 1.06 мкм [56]. Значения параметра Келдыша при этом превышают величину 20, что говорит о преобладании именно многофотонной ионизации в указанной выше работе. Данные параметры лазерного излучения в фокальной области требуют оборудования, превышающего по энергии в импульсе имеющееся в распоряжении в рамках настоящей работы. Вследствие этого был предложен способ создания лазерно-индуцированной плазмы не в газе, а на поверхности металлической мишени.

Тем не менее, указанный процесс ионизации необходим, в основном, для создания свободных электронов в веществе, которые служат в качестве затравочных для последующего процесса ионизации, известного как лавинная фотоионизация [57,58]. Таким образом, используя поверхности материалов с большой концентрацией свободных электронов (металлы, а также полупроводники с большим уровнем легирования) в качестве мишени можно снизить технические требования к системе создания затравочных электронов и использовать более доступные источники лазерного излучения и более простые системы его фокусировки для создания лазерной плазмы.

Лавинная фотоионизация

Лавинная ионизация включает в себя циклический процесс поглощения фотонов на свободных носителях (тормозное поглощение) с последующей ударной ионизацией [57]. Свободные электроны в зоне проводимости начинают поглощать дополнительные фотоны в ходе линейного процесса обратного тормозного поглощения, последовательно переходя в более высокие энергетические состояния в зоне проводимости [58]. Для выполнения законов сохранения энергии и импульса электрон при поглощении фотона должен передавать импульс за счет испускания фонона или путем рассеяния на примеси [59].

В области с высокой концентрацией свободных электронов процесс лавинной ионизации преобладает над нелинейным поглощением. Лавинная ионизация при этом ограничена концентрацией свободных электронов и длительностью лазерного импульса.

Поглощение в индуцированной плазме

Электронная плазма, образующаяся вследствие лавинной ионизации, начинает поглощать энергию лазерного излучения, когда её плотность становится достаточно высокой. Поглощение в лазерно-индуцированной плазме можно описать с помощью модели Друде. Для плотности плазмы N [60]:

$$N = \omega^2 m \varepsilon_0 / e^2 \tag{11}$$

где ω – частота лазерного излучения, а коэффициент поглощения может быть оценен величиной

$$\aleph = \frac{\omega_p^2 \tau}{c(1 + \omega^2 \tau^2)} \tag{12}$$

где τ – время рассеяния в модели Друде (0.1-1 фс), а ω_p – плазменная частота

$$\omega_p = \sqrt{\frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m}} \tag{13}$$

При высокой плазменной частоте (высокой плотности электронов) коэффициент поглощения плазмы резко возрастает согласно формуле 13. Это приводит к увеличению аккумулируемой энергии в области фокального пятна и плазмы.

Вследствие нелинейной и лавинной ионизации в фокальной области индуцируется электронная плазма, которая сопровождается пространственным перераспределением зарядов. По этой причине происходит кулоновский взрыв материала, который формирует ударную волну [61–64].

Электронная плотность и температура плазмы на начальном этапе довольно слабо зависят от материала мишени и длительности лазерного импульса [44,65] и находятся в диапазоне 10^{18}-10^{20} см$^{-3}$ и 10^{4}-10^{5} K, соответственно.

Плазма, создаваемая наносекундными и субнаносекундными лазерными импульсами, является нестационарным объектом, где наряду с процессами оптического пробоя и поглощения энергии лазерного излучения с подъемом температуры и давления, наблюдается процесс разлета плазмы в окружающую среду (газ или вакуум) и формирование потока излучения.

Спектр излучения лазерной плазмы быстро изменяется во времени из-за процессов разлета и рекомбинации, приводящих к остыванию плазменного облака. Тем не менее известно, что на начальной стадии существования плазмы, сравнимой с длительностью импульса лазерного излучения, значительная часть энергии излучения приходится на область вакуумного УФ с энергией кванта, превышающей потенциал ионизации любых атомов и молекул.

Излучение лазерной плазмы может быть использовано в масс-спектрометрии для ионизации органических соединений в газовой фазе. В этом случае жесткое ультрафиолетовое (УФ) излучение на начальной стадии существования лазерно-индуцированной плазмы обеспечивает ионизацию любых органических соединений и молекул воды [1,43,47,66]. Хотя в масс-спектрометрии плазма может создаваться как в объеме газа, так и на поверхности металлической мишени, последняя схема представляется предпочтительной, поскольку порог лазерного пробоя для газов на 1-2 порядка выше, и использование металлической мишени требует значительно менее мощного лазера и снижает требования к фокусирующей оптике, как было отмечено выше.

1.12 Излучение плазмы

Под излучением плазмы принято понимать электромагнитные волны (в диапазоне от радиоволн до рентгеновских), которые испускаются частицами плазмы при их индивидуальном и коллективном движении. Спектральный состав и интенсивность излучения отражают состояния плазмы, поэтому используются для ее диагностики. Излучение является одним из

основных каналов потерь энергии частиц из плазмы. По типу спектра излучения можно выделить следующие механизмы:

1) излучение с непрерывным спектром – тормозное и рекомбинационное (для высокотемпературной плазмы в магнитном поле – циклотронное);

2) линейчатое – излучение возбужденных атомов и молекул. Форма и ширина линии поглощения(излучения) определяется временем жизни уровней перехода, доплеровским эффектом, эффектом взаимодействия уровней при столкновении частиц.

Спектр излучения слабоионизированной плазмы является линейчатым: в нем преобладают узкие линии излучения возбужденных неионизированных атомов и недиссоциировавших молекул. По мере уменьшения температуры плазмы степень ионизации уменьшается, а интенсивность линейчатого излучения усиливается. Основными типами излучения, определяющими сплошной спектр, являются тормозное и рекомбинационное излучения. Тормозное излучение возникает при рассеянии заряженных частиц друг на друге. Рекомбинационное излучение сопровождает процесс рекомбинации, тогда в результате столкновения электрона и иона образуется нейтральный атом или степень ионизации многозарядного иона понижается.

Возможные переходы электронов в плазме можно разделить на связанно-связанные, связанно-свободные (свободно-связанные) и свободно-свободные. Примером последних являются тормозное излучение и тормозное поглощение при движении электрона вблизи атома (иона). Связанно-свободные переходы происходят при фотоионизации (реже оже-ионизации) атома, свободно-связанные при захвате электрона (фоторекомбинации). Связанно-связанные можно разделить на спонтанные и вынужденные. К вынужденным относятся как поглощение фотона, так и его вынужденное излучение, индуцированное пролетающим рядом первичным фотоном. В последнем случае, излученный фотон имеет ту же фазу, что и первичный. В этом случае речь идет о когерентном излучении.

Тормозное излучение

Тормозное излучение вследствие электрон-электронных столкновений мало, так при столкновении одинаковых частиц дипольное излучение отсутствует. Тормозное излучение характерно для высокотемпературной плазмы со значительной степенью ионизации. Оно имеет непрерывный спектр и возникает при рассеянии электронов и легких ионов (водород, гелий) в кулоновском поле ионов и является главным источником излучения при высокой электронной температуре. Спектр фотонов тормозного излучения непрерывен и обрывается при максимально возможной энергии, равной начальной энергии электрона. Согласно классической электродинамике, интенсивность тормозного излучения пропорциональна квадрату ускорения

заряженной частицы. Так как ускорение обратно пропорционально массе m частицы, то в одном и том же поле излучение легчайшей заряженной частицы — электрона будет, например, в миллионы раз мощнее излучения протона. Поэтому, чаще всего наблюдается и практически используется излучение, возникающее при рассеянии электронов на электростатическом поле атомных ядер и электронов [20,67].

Рекомбинационное излучение

В результате процессов рекомбинации электронов с ионами в плазме возникает излучение с непрерывным спектром. Процесс рекомбинации – это процесс, который является обратным процессу ионизации. Баланс процессов ионизации и рекомбинации определяет стационарное состояние плазмы. Излучательная рекомбинация является одним из возможных каналов, наряду, например с безизлучательным процессом тройной рекомбинации. Однако в разряженной или слабоионизированной плазме (например плазма тлеющего разряда) канал тройной рекомбинации маловероятен, так как требует высокой концентрации заряженных частиц. В элементарном акте прямой излучательной рекомбинации свободный электрон, в результате взаимодействия с электрическим полем иона захватывается на один из дискретных энергетических уровней, при этом «высвечивается» энергия, равная разнице энергии связи электрона и его первоначальной кинетической энергии. При фоторекомбинации на n-й уровень положительного иона испускается фотон с энергией

$$\mathrm{h}\nu = \frac{m_e v^2}{2} + E_n,$$

где En - энергия уровня (отсчитанная от границы ионизации).

При hν > En интенсивность убывает как $e^{-(h\nu - E_n)}$. То есть вероятность излучательной рекомбинации максимальна, когда энергия электрона мала и лежит в пределах разницы энергии между соседними уровнями. Рекомбинация при захвате электрона на такой уровень устойчива лишь в том случае, если электрон достаточно быстро переходит после захвата на более низкий уровень (например, с излучением). Таким образом, такого рода «безизлучательная» рекомбинация иона все-таки заканчивается актом испускания кванта, хотя уже значительно меньшей энергии. И в этом случае, захват может происходить не только на наинизший свободный уровень иона, но и также на уровни, соответствующие различным возбужденным состояниям (при «захвате» заряд иона понижается на единицу). Поэтому после актов рекомбинации может происходить высвечивание возбужденных ионов (или атомов) с испусканием фотонов, принадлежащих к линейному спектру. Таким образом, спектр рекомбинационного излучения представляет собой совокупность "зубцов", каждый из которых имеет резкий край и примыкает к границе соответствующей спектральной серии линейчатого

спектра. Вероятность рекомбинации на n-й уровень с ростом n убывает, зубцы сгущаются и, наконец, сливаются. Интенсивность рекомбинационного излучения уменьшается с увеличением кинетической энергии электрона и очень сильно зависит от заряда иона [68].

Линейчатое излучение

В изотемпературной плазме с небольшой степенью ионизации (например, газоразрядная плазма) главным источником излучения становятся возбужденные атомы и молекулы. Поэтому излучение холодной плазмы имеет преимущественно линейчатый характер. При малых T_e интенсивность линейчатого излучения может на несколько порядков превосходить интенсивность сплошного спектра рекомбинационного и тормозного излучения. Поскольку состав линейчатого спектра и интенсивность входящих в него спектральных линий чрезвычайно сильно зависит от индивидуальных свойств атомов и ионов плазмы, то трудно установить общие количественные закономерности, характеризующие зависимость выхода линейчатого излучения от электронной температуры (в особенности для многокомпонентной плазмы). Однако в общем можно отметить, что интенсивность линейчатого излучения быстро падает при увеличении электронной температуры (высокой степени ионизации плазмы), потому как уменьшается вероятность процесса захвата на возбужденные связанные состояния. Ширина спектральных линий линейчатого спектра в основном определяется Доплер-эффектом и межатомным Штарк-эффектом.

Анализ линейчатого спектра плазмы является мощным инструментом для диагностики плазмы. Анализ доплеровской составляющей дает возможность оценивать температур плазмы, а штарковская компонента уширения позволяет оценить концентрацию заряженных частиц и степень ионизации плазмы [68].

Циклотронное излучение

В магнитном поле ларморовское вращение электронов плазмы приводит к появлению так называемого магнитотормозного излучения на гармониках циклотронной частоты, особенно существенного при больших (релятивистских) энергиях электронов. В области низких частот циклотронное излучение характеризуется линейчатым спектром, который переходит в сплошной спектр в области высоких частот; в достаточно плотной плазме циклотронное излучение в плазме же и поглощается, не выходя наружу.

1.13 Лазерная плазма, создаваемая субнаносекундными импульсами

Исследованию лазерно-индуцированной плазмы, лазерной абляции и их применению посвящен ряд работ [50,69,70], в которых использовались лазеры с разной длиной волны и длительностью импульсов излучения, различные материалы мишени, различные газовые среды

в широком диапазоне давлений. В частности, показано, что плазма, создаваемая лазерным излучением наносекундной и субнаносекундной длительности на металлической мишени при атмосферном давлении, в первые несколько наносекунд занимает собой полусферу с диаметром приблизительно равным диаметру лазерного пятна, а внешняя поверхность полусферы ограничена ударной волной [65,71]. В качестве примера на Рисунке 7 представлена серия изображений, показывающих пространственно-временную эволюцию плазменного факела на ранней стадии его разлета.

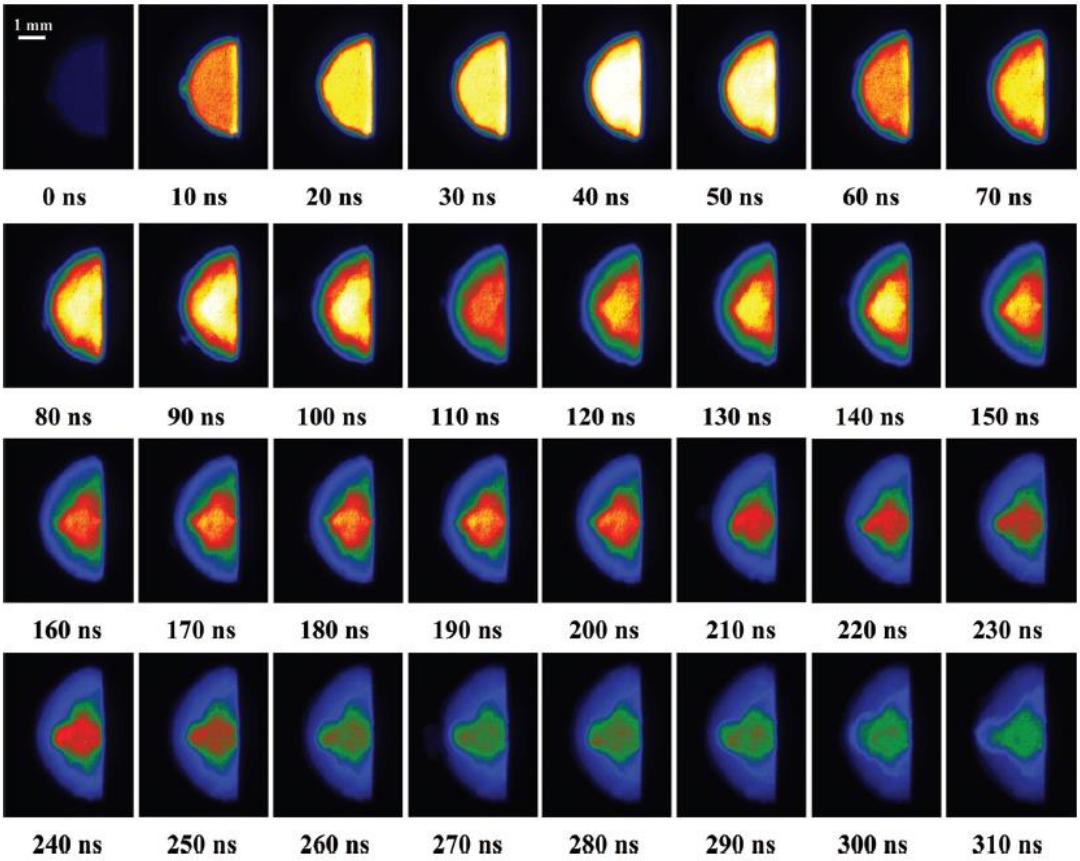

Рисунок 7 - Серия изображений, показывающих пространственно-временную эволюцию плазменного шлейфа [65]. Цвета на изображениях обозначают разные значения интенсивности излучения.

Лазерная абляция алюминиевого образца проводилась с интенсивностью лазерного луча 8,16 ГВт/см^2 в воздухе при атмосферном давлении. В этом эксперименте плазма создавалась лазером Nd:YAG (Quantel Brilliant b), излучающим лазерные импульсы длительностью 5,1 нс на длине волны 1064 нм с частотой повторения 10 Гц. Максимальная энергия в импульсе 0,974 Дж. Луч фокусировался на поверхность образца с помощью линзы с фокусным расстоянием 1 м. Диаметр лазерного пятна составлял 1,72 мм. Плотность мощности лазерного излучения варьировалась от 2,74 до 8,16 ГВт/см^2. В этих условиях время жизни плазмы составляет порядка

нескольких микросекунд, но записи велись только в течение первых 330 нс. Моменты жизни плазмы, при которых были сделаны снимки, указаны под снимками. Цвета на изображениях обозначают разные значения интенсивности излучения. Белый цвет соответствует максимальной, а черный – минимальной интенсивности излучения.

Излучение плазмы в этом эксперименте регистрировалось в видимом диапазоне. Поэтому наибольшая интенсивность излучения достигалось после лазерного импульса на стадии разлета плазмы. Жесткое УФ излучение плазмы, как это будет показано далее, существует при наибольшей температуре плазмы, возникающей к моменту окончания лазерного импульса.

1.14 Применение в спектроскопии.

Временные и спектральные параметры излучения лазерной плазмы на начальном этапе ее развития, обеспечивающим генерацию жесткого УФ, ранее исследовались недостаточно, так как большинство работ направлено на исследование лазерной плазмы на поздних стадиях разлета, когда в излучении относительно холодной плазмы регистрируются линии ионов элементов мишени.

Эмиссионный спектр лазерно-индуцированной плазмы, возникающий на поздних стадиях разлета, используется для элементного анализа твердых образцов в методе Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), который был впервые продемонстрирован вскоре после изобретения лазера и интенсивно развивался в течение несколько десятилетий [72–74]. Спектроскопия лазерного пробоя стала очень популярным аналитическим методом в последнее десятилетие ввиду некоторых ее уникальных особенностей, таких как применимость к любому типу образца, практически полное отсутствие пробоподготовки, возможность дистанционного зондирования и скорость анализа [69,70]. В практических приложениях наибольшие сложности вызывают проблемы градуировки и ограничения пределов определения (около 100 ppm) [75].

Большинство работ по исследованию излучения лазерной плазмы ориентированы на решение задач LIBS и направлены на изучение плазмы на поздних стадиях разлета, когда в излучении относительно холодной плазмы проявляются характеристические спектральные линии материала мишени. Временные и спектральные параметры излучения лазерной плазмы на начальном этапе ее развития, когда она может служить локализованным компактным источником жесткого УФ излучения, обеспечивающим формирование ионов органических соединений для целей масс-спектрометрии, исследованы недостаточно. Излучение лазерной плазмы используется для адсорбционной спектроскопии в области вакуумного ультрафиолетового и мягкого рентгеновского излучения. Метод основан на том, что плазма, формируемая наносекундными и субнаносекундными лазерными импульсами, в первые

несколько наносекунд излучает непрерывный спектр, простирающийся от видимого до мягкого рентгеновского диапазона [76,77]. Было показано, что наличие спектрального континуума излучения лазерной плазмы характерно для всех исследованных металлов, а длительность излучения континуума в области жёсткого УФ сравнима с длительностью лазерного импульса (25 нс в эксперименте, описанном в работе [77]).

1.15 Летучие органические соединения живых организмов

Летучие органические соединения, формируемые живыми организмами в процессе метаболизма, в последнее время исследуются различными методами [78–82]. Практически каждое заболевание или повреждение организма вызывают изменение в метаболизме, что приводит к изменению состава или соотношения ЛОС. Это глистные инвазии [83,84], инфекционные заболевания [85–88], иммунизация [89], хронические заболевания [90], повреждения головного мозга и даже небольшая физическая травма [91], например, от инъекции. Было показано также, что ЛОС, маркирующие онкологические заболевания, с высокой вероятностью присутствуют в выделениях организмов – образцах выдыхаемого воздуха, моче [92–94] и фекалиях человека и животных. ЛОС могут быть обнаружены и инструментальными методами, прежде всего, масс-спектрометрами, и использоваться не только как биомаркеры для диагностики различных заболеваний, но и для разработки быстрого скрининга. Очень важно, что «летучие маркеры» болезни присутствуют в естественных выделениях организма и их сбор - неинвазивная процедура, что очень существенно для тяжелобольных людей и маленьких детей. Так как анализ мочи входит в общее медицинское обследование и моча, в отличие от выдыхаемого воздуха, практически не содержит экзогенных соединений, с нашей точки зрения, именно анализ мочи наиболее перспективен для поиска ЛОС, связанных с заболеванием.

Летучие органические соединения, выделяемые организмом, относятся к различным химическим классам и отличаются потенциалом ионизации, энергией сродства к протону и электрону и спектром поглощения оптического излучения. Так как информация о состоянии организма заключается в основном в соотношении концентраций различных соединений, то идеальный масс-спектрометр должен детектировать весь набор летучих соединений с приблизительно равной чувствительностью. Однако реализовать такой режим не удается в силу ряда причин. Ключевой проблемой здесь является способ получения ионов соединений, которые далее регистрируются масс-спектрометром.

1.16 Летучие органические соединения человека

Многообещающим направлением метаболомики (metabolomics), является волатоломика (volatomics), а именно научное исследование химических процессов, включающих профили

высоколетучих и полулетучих органических соединений. Температуры кипения этих соединений варьируются от <0°C (например, пропан) для легколетучих органических соединений до 50-250°C (например, ацетон, лимонен) для летучих органических соединений и до 250-380°C (например, фталаты) для полулетучих органических соединений. ЛОС, характерные заболеваниям, образуются в основном за счет изменений в определенных биохимических путях в организме: в инфицированных клетках и их микроокружении, в крови, в дыхании, в выделениях кожи, в моче, в фекалиях, в слюне. Сообщается о 1764 различных ЛОС из общего числа обнаруженных 2577 в различных физиологических жидкостях у здоровых людей [78,95].

Академик РАН Андрей Валерьевич Лисица в статье «Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам» [96] пишет, что: «…Надежды, возлагаемые учеными и медиками на расшифровку генома человека, на сегодняшний день не оправдались. В практическом плане в результате расшифровки генома возник гигантский рынок биотехнологической продукции, но не более того. Прогресс достигнут в диагностике редких заболеваний, что, скорее, связано не столько с развитием постгеномных технологий, сколько с изобретением ПЦР более 30 лет назад. Прорыва в диагностике и лечении социально-значимых заболеваний не удалось достигнуть даже тогда, когда геномика была дополнена постгеномными методами исследования транскриптома и протеома. Одна из причин, как уже указывалось выше, связана с недостаточной чувствительностью аналитических методов». В этой работе автор рассматривает масс-спектрометрические подходы анализа биологических проб, используемые в метаболомике и волатоломике, относя их к постгеномной медицине, позволяющие получить широкополосную развертку молекулярного состава биологического образца как путь для решения проблем скрининговой медицины. Волатоломика относится к -омиксным технологиям и представляет собой раздел химии, изучающий летучие органические соединения, выделяемые биологической системой в определенных экспериментальных условиях. В биологии методы «омики» используются для высокопроизводительного анализа последовательностей ДНК и эпигенетических модификаций (геномика, англ. genomics), транскриптов мРНК и микроРНК (транскриптомика, англ. transcriptomics), экспрессированных белков (протеомика, англ. proteomics), а также синтезированных метаболитов (метаболомика) в биологической среде системы.

В образцах слюны человека было зарегистрировано приблизительно 550 летучих органических соединений [2]. Пассивная диффузия является наиболее распространенным путем переноса ЛОС из крови в слюну. Таким образом, биохимическая информация в крови отражается ЛОС в слюне. Ряд исследований подтвердил корреляцию между ЛОС в крови и слюне, что потенциально может быть использовано для метаболических и физиологических исследований

[97–101]. Тем не менее, следует подчеркнуть, что, помимо ЛОС крови, слюна потенциально может содержать ЛОС, образующиеся из выделений экссудата десен, полости носа, желудочно-кишечного рефлюкса, остатков пищи, микроорганизмов ротовой полости, коммерческих продуктов и загрязнения окружающей среды.

В образцах фекалий человека было зарегистрировано около 480 летучих органических соединений [102]. Типичными ЛОС, образующимися в кишечнике в результате бактериальной ферментации, являются метан и водород. Эта микробиота также отвечает за специфический запах фекалий, возникающий в результате ферментации аминокислот в толстой кишке, и включает ряд химических соединений, таких как алифатические амины, аммиак, жирные кислоты с разветвленной цепью, производные фенола или индола, и летучие серосодержащие соединения [103]. Среди зарегистрированных ЛОС фекалий в значительных концентрациях обнаружены короткоцепочечные жирные кислоты, жирные кислоты с разветвленной цепью, индолы и фенолы. Спирты, вероятно, являются результатом восстановления кислот кишечными бактериями. Различные идентифицированные ароматические соединения являются результатом ферментации кишечными бактериями, при этом некоторые ароматические летучие органические соединения (например, фураны) считаются результатом метаболизма фруктозы комменсальными организмами, включая грибы.

В экстрактах кожи человека было идентифицировано более 600 ЛОС [2]. Состав летучих органических соединений кожи человека очень разнообразен, но представлено лишь несколько химических семейств, таких как альдегиды, алканы, карбоновые кислоты с различной длиной цепи и производные сложные эфиры, короткоцепочечные спирты и некоторые кетоны [104]. ЛОС из кожи часто возникают либо в результате секреции желез, либо в результате метаболизма кожной микробиоты на поверхности. Распределение желез на поверхности кожи частично отражает разницу в ЛОС, выделяемых отдельными частями человеческого тела. Важно отметить, что при некоторых кожных заболеваниях, например при меланоме, может происходить прямое выделение летучих органических соединений из пораженной кожи [105]. Помимо эндогенных ЛОС, выделяемых через кожу, экзогенные ЛОС, такие как связанные с ЛОС ксенобиотики, лекарственные препараты и диетические виды, также могут выделяться из кожи и могут проявлять значительную изменчивость среди субъектов.

Многие летучие органические соединения, в основном водорастворимые, выводятся из организма с мочой, которая на 91-96% состоит из воды. Содержание летучих органических соединений в моче в основном определяется тремя почечными процессами: клубочковой фильтрацией, канальцевой реабсорбцией и канальцевой секрецией. Недавний обзор [2] сообщает о ЛОС в урине человека. ЛОС в моче относятся к целому ряду химических соединений: кислоты,

спирты, кетоны, альдегиды, амины, N-гетероциклы, O-гетероциклы, соединения серы и углеводороды. Моча содержит много кетонов, в основном в результате ферментативного нарушение функции печени из-за чрезмерного окисления жира и неспособности цикла Кребса перерабатывать избыток трикарбоновых кислот ацетил-кофермент А; в меньшей степени это также является результатом активности бактерий в кишечнике. Высокий уровень кетоновых тел также был обнаружен у больных сахарным диабетом. Различные летучие органические соединения (особенно терпены) считаются результатом переваривания пищи. Дополнительные экзогенные ЛОС, в основном возникающие в результате употребления медицинских и немедицинских препаратов, выводятся с мочой и, таким образом, могут влиять на профиль ЛОС в моче [106–108].

В настоящее время в образцах выдыхаемого воздуха было обнаружено 1488 ЛОС [2], что делает его наиболее изученным источником ЛОС. Дыхание представляет собой смесь, в которой преобладают обычные неорганические компоненты воздуха, но она также содержит небольшую долю ЛОС в диапазоне от ppbv до ppm. ЛОС могут производиться в любом месте тела и могут переноситься через кровоток в легкие, где они выдыхаются при дыхании. Медицинскому сообществу давно известно, что характерный запах изо рта пациента иногда может указывать на конкретное заболевание. Довольно много летучих соединений может быть связано с употреблением пищи, лекарствами или профессиональным воздействием, некоторые соединения в выдыхаемом воздухе производятся бактериями во рту, например, водород и метан [109].

Основная привлекательность анализа ЛОС человека как для клиницистов, так и для пациентов заключается в том, что это неинвазивный и безболезненный метод. Такой подход «волатоломики» полностью отличается от некоторых традиционных методов диагностики заболеваний и последующего наблюдения, например, в случае злокачественных заболеваний. Он выявляет заболевание на основе изменений химического состава крови и метаболической активности, а не на основе визуализации или патогенетических морфологических изменений. Такая методика сравнительно проста, а результаты могут интерпретироваться автоматически. Скрининг обращает внимание человека на риски возникновения проблем со здоровьем и предполагает дальнейшее консультирование у специалиста. В последствие только пациентам с положительным результатом тестирования потребуются обычные, неприятные и дорогостоящие визуализационные методы диагностики (например, биопсия, КТ, МРТ) для подтверждения их диагноза, прежде чем будет принято решение о его ведении и лечении. Ожидается, что преимущества раннего выявления и лечения значительно повысит показатели излечимости и снизить расходы на здравоохранение [110].

1.17 Значимость метода получения масс-спектров ионов ЛОС без пробоподготовки

При анализе ЛОС биологических объектов важно использовать метод, исключающий длительную пробоподготовку. Даже при непродолжительном пребывании пробы на воздухе меняется соотношение компонентов в образце, как в результате испарения воды и сокращения количества наиболее летучих составляющих, так и под воздействием микрофлоры, разлагающей компоненты образцов. Поэтому важно по возможности сократить их пребывание при комнатной температуре. Можно обеспечить длительное хранение отобранных проб в замороженном виде, но после размораживания они должны быть введены в прибор за минимальное время. Например, молекулярный состав мочи может изменяется в зависимости от времени, поскольку ацетоуксусная кислота быстро преобразуется в ацетон, а бактерии, рост которых может происходить в моче, если они в ней присутствуют, могут активно перерабатывать ацетоуксусную кислоту [111].

Выводы по главе 1

Обзор научной литературы показал актуальность исследования по вопросу получения ионов летучих органических соединений путем ионизации ультрафиолетовым излучением лазерной плазмы. В этой главе по литературным данным был проведен анализ основных процессов, приводящих к ионизации летучих органических соединений, рассмотрены основные методы получения ионов в масс-спектрометрии ЛОС, описаны каналы ионизации рассмотренных методов. В этой главе были проанализированы основные стадии образования лазерной плазмы на поверхности металлической мишени под действием субнаносекундных лазерных импульсов.

Из анализа литературных данных следует, что плазма, создаваемая лазерным излучением наносекундной и субнаносекундной длительности на металлической мишени при атмосферном давлении, в первые несколько наносекунд занимает собой полусферу с диаметром приблизительно равным диаметру лазерного пятна. Внешняя поверхность полусферы ограничена ударной волной [42,44]. Электронная плотность и температура плазмы, формируемой излучением с плотностью мощности 10^9-10^{10} Вт/см^2 на начальном этапе довольно слабо зависят от материала мишени [112,113] и находятся в диапазоне 10^{18}-10^{20} см$^{-3}$ и 10^4-10^5 K.

Анализ литературных данных показывает, что APLPI является новым перспективным методом ионизации для применения в масс-спектрометрии ЛОС. Однако, важные вопросы для развития метода остаются невыясненными. Такими вопросами являются: характеристика лазерной плазмы как источника излучения, влияние состава газа, в котором происходит ионизация ЛОС при атмосферном давлении. В случае использования для ионизации

широкополосного излучения, спектр которого не ограничен оптическими элементами, возможна реализация нескольких каналов образования ионов ЛОС. Однако эти каналы ранее не исследовались. Наконец важными параметрами, ранее не определёнными экспериментально, являются пределы обнаружения и чувствительности метода. Лазерная плазма является уникальным источником излучения, интенсивность которого может изменяться, в отличии от УФ ламп, в очень широких пределах, что важно для обеспечения высокой чувствительности масс-спектрометрических методов анализа ЛОС.

Глава 2 Ионизация ЛОС излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении

Данная глава посвящена методам экспериментального и теоретического моделирования, использованным в работе. Приведено описание источника ионов и камеры ионизации, использованных в работе. Важной частью работы является определение параметров лазерной плазмы, генерируемой на мишени из нержавеющей стали, на начальном этапе ее формирования. В работе исследованы особенности ионизации летучих органических соединений разных классов и влияния окружающей газовой среды на образование ионов ЛОС и эффективность ионизации. Охарактеризовано излучение лазерной плазмы и его распространение в различных средах. Описаны методики определение характеристик излучения лазерной плазмы. Исследованы каналы образования ионов аналитов и качественно описан механизм формирования ионов в ионном источнике. Проведено сравнение относительной эффективности ионизации в различных газовых средах, определена чувствительность метода, пороги обнаружения и вероятность ионизации для ряда ЛОС, для чего измерен коэффициент пропускания масс-спектрометра.

2.1 Ионный источник

Схема ионного источника приведена на Рисунке 8. Ионный источник располагался перед выпускным отверстием масс-спектрометра внутри изолированной камеры, находящейся при атмосферном давлении. Камера снабжена окнами для ввода лазерного излучения и патрубками позволяющими подавать в камеру пары исследуемых соединений в потоке атмосферного воздуха или в потоке инертных газов (азот 99.99, аргон 99.995). В большинстве экспериментов давление в камере поддерживалось несколько выше атмосферного, чтобы избежать влияния примесей, находящихся атмосферном воздухе лаборатории.

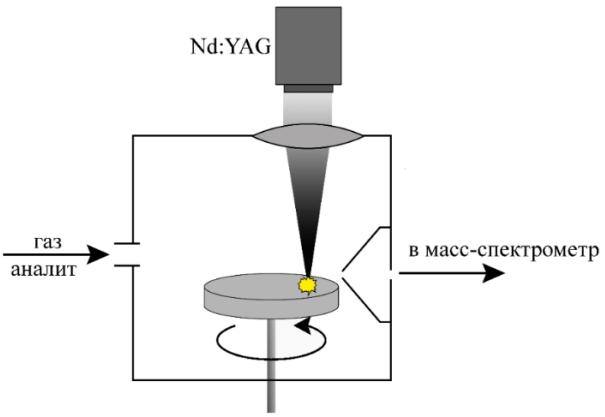

Рисунок 8 – Схема ионного источника.

Для создания плазмы на поверхности металлической мишени был использован твердотельный Nd^{3+}:YAG лазер с диодной накачкой RL-03/355 (ООО «ЭЛС-94») с длительностью импульса ~0,5 нс, энергией 250 мкДж в импульсе и частотой повторения импульсов 1-300 Гц. Излучение лазера с длиной волны 1064 нм сфокусировалось на мишень из нержавеющей стали линзой с фокусным расстоянием 50 мм в пятно диаметром около 30 мкм, создавая на ней плазму оптического пробоя. Мишень была выполнена в виде диска и вращалась с частотой ~30 оборотов в минуту. Вращение практически исключает влияние эрозии материала мишени под действием лазерного излучения на формирование плазмы. Расстояние от места образования плазмы на мишени до плоскости диафрагмы составляет 3 мм. Плотность энергии излучения составляла ~35 Дж/см^2, что соответствует плотности мощности ~70 ГВт/см^2.

Ионизованные ультрафиолетовым излучением лазерной плазмы частицы (атомы и молекулы) двигаются в газовом потоке. Далее ионы через напускное отверстие диаметром 300 мкм попадают в вакуумную камеру первой ступени откачки масс-спектрометра с давлением 3 Торр. Ионы, образованные в результате ионизации вещества излучением лазерной плазмы, движутся внутри ионизационной камеры при давлении, близком к атмосферному, до момента их попадания в высоковакуумную часть масс-спектрометра. Движение ионов на данном этапе определяется динамикой газовых потоков и распределением создаваемого электродами электрического поля внутри камеры. Время, в течение которого ионы находятся в ионизационной камере, составляет несколько десятков миллисекунд. Известно, что при атмосферном давлении молекула испытывает порядка 10^{10} столкновений в секунду. Поэтому за время движения иона внутри камеры ионизации он испытывает $\sim 10^7$ столкновений, что приводит к изменению состава и концентрации ионов за счет рекомбинации и вторичных реакций с передачей заряда.

С помощью компьютерного моделирования было получено распределение модуля скорости газового потока и траектории движения частиц в рассматриваемом ионном источнике [114,115]. Рисунок 9 демонстрирует распределение модуля вектора скорости газового потока в сечении, проходящем через центр диафрагмы перпендикулярно плоскости мишени. Скорость потока вблизи точки возникновения лазерной плазмы на мишени составляет $\sim$ 0.1 метра в секунду и, возрастая до $\sim$ 200 м/с в плоскости диафрагмы, на выходе из диафрагмы превышает локальную скорость звука.

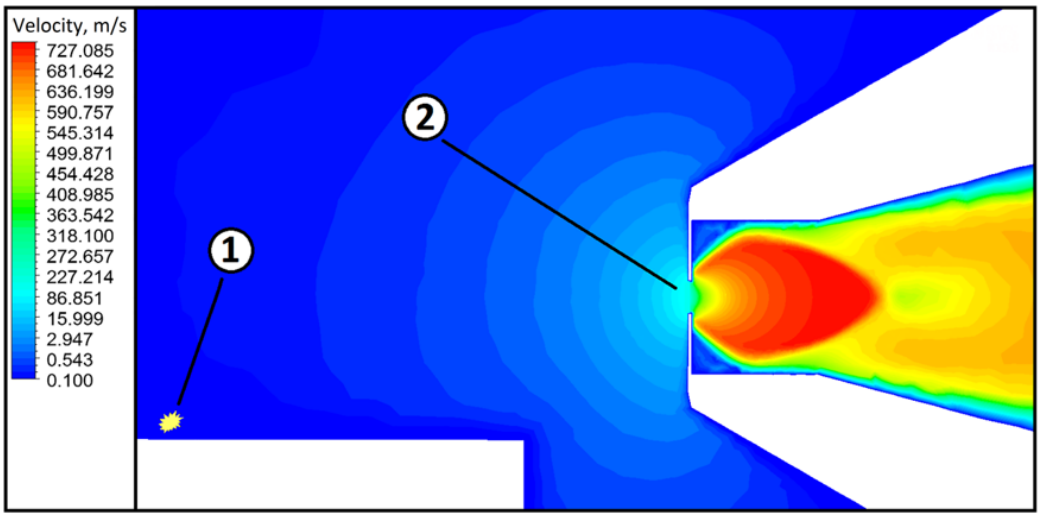

Рисунок 9 - Распределение модуля скорости газового потока в плоскости сечения, проходящего через центр диафрагмы перпендикулярно плоскости мишени: 1 — плазма на поверхности мишени, 2 — диафрагма [114]

На Рисунке 10, представлены траектории движения ионов между мишенью и диафрагмой масс-спектрометра. Для удобства визуализации количество траекторий уменьшено.

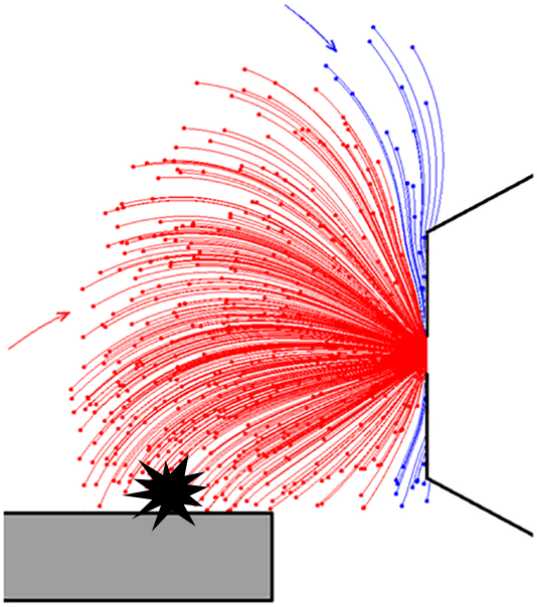

Рисунок 10 - Траектории движения ионов внутри камеры ионизации (вид сбоку): Траектории красного цвета проходят сквозь диафрагму, синие — заканчиваются на стенках диафрагмы.

Из области, близкой к торцу входной части масс-анализатора, где расположена диафрагма, в вакуумную часть попадают ионы, расположенные близко к оси диафрагмы. В противном случае они «теряются» при столкновении с торцевой плоскостью.

2.2 Спектральные и временные параметры излучения лазерной плазмы

В проведенных экспериментах наиболее важными параметрами плазмы, как источника жесткого УФ излучения, ионизирующего органические молекулы, являются спектр излучения, связанный с температурой плазмы, и время существования жесткого ультрафиолетового излучения. Для оценки параметров плазмы была использована установка, состоящая из камеры, в которой создавалась лазерная плазма, и спектрометра видимого и ближнего УФ диапазона (Рисунок 11).

Спектр излучения лазерной плазмы регистрировался спектрометром JobinIvonTHR1000 с решеткой 1800 шт/мм и многоканальным матричным фотоприемником со стробируемым усилителем яркости Princeton Instruments PI-MAX3. Минимальная длительность строб-импульса составляла 5 нс, регистрируемый спектральный интервал ~ 8-10 нм в области 350-400 нм, а спектральное разрешение ~ 0.04 нм было ограничено пространственным разрешением фотокатода усилителя яркости. Лазерное излучение было направлено перпендикулярно плоскости мишени, повернутой на 45° относительно оси спектрометра как показано на Рисунке 11. Излучение плазмы фокусировалось на входную щель спектрометра линзой с фокусным расстоянием 100 мм так, что изображение плазмы в плоскости щели строилось с соотношением 1:1, и размер этого изображения (30 мкм) был меньше ширины щели 50 мкм.

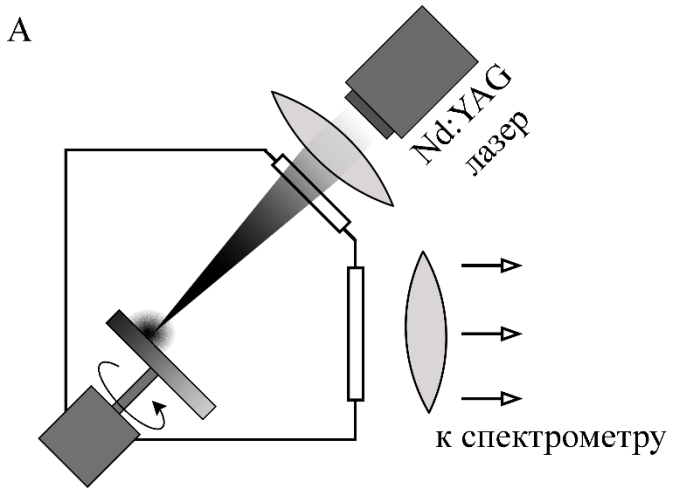

Рисунок 11 - Схема эксперимента для определения параметров лазерной плазмы

Для исследования динамики излучения с временным разрешением, лучшим, чем длительность строб-импульса, была использована оптическая линия задержки лазерного импульса, размещенная между лазером и фокусирующей линзой. В результате строб-импульс мог опережать лазерный импульс на 6 нс. Это дало возможность снять начальный участок временной зависимости спектров излучения с разрешением 1 нс, применив процедуру коррекции результатов спектральных измерений, которая заключается в последовательной регистрации

спектров излучения, накопленных за время строб-импульса (~5 нс), со сдвигом в 1 нс и последующем вычитании спектра, накопленного в предшествующем измерении, из «текущего» спектра.

На Рисунке 12 приведены спектры излучения лазерной плазмы, полученные при облучении мишени из нержавеющей стали в воздухе. Как видно из Рисунка 12, сразу после воздействия лазерного импульса в спектре излучения плазмы нет выраженных линий, что объясняется высокой температурой и высокой локальной плотностью плазмы. В таких условиях формируется спектр излучения близкий к спектру излучения черного тела [74,116]. Поскольку в эксперименте регистрировался ограниченный спектральный интервал, то это не позволило применять известные соотношения для спектра излучения черного тела на начальных стадиях существования лазерной плазмы. Однако на более поздних стадиях в спектре излучения на фоне сплошной спектральной компоненты, характерной для излучения черного тела, вследствие охлаждения плазмы начинают проявляться узкие спектральные линии атомов и ионов.

Регистрация линейчатого спектра атомов обеспечивает возможность оценки параметров излучения плазмы на начальной стадии. Для этого используется подход, основанный на сопряжении температуры плазмы, определенной на поздних стадиях ее существования по отношению интенсивностей излучения линий, и температуры, определенной по уровню интенсивности сплошной компоненты излучения в том же спектральном диапазоне [117]. Возможность применения этого подхода обусловлена предположениями о термодинамическом равновесии плазмы на всех стадиях ее существования и о возможности описания сплошной компоненты в излучении плазмы формулой Планка для излучения черного тела в выбранном спектральном интервале.

Для достаточно больших времен существования лазерной плазмы, когда спектр излучения плазмы можно представить как сумму набора линий и сплошной спектральной компоненты, можно определить температуру, используя распределение Больцмана для относительной заселённости электронами различных уровней энергии атомов в плазме. Далее по формуле Планка вычисляется температура на начальном участке разлета плазмы, когда спектральные линии не наблюдаются.

Для спектральных измерений был выбраны участки спектра вблизи 380 нм и 360 нм с наиболее сильными линиями железа, которые заметно отличаются по величине энергии верхнего состояния. Характеристики выбранных в окрестности 380 нм спектральных линий приведены в Таблице 2.

Таблица 2 Спектроскопические параметры линий излучения атомов железа, использованные для оценки температуры плазмы [118]

λ [nm]	A_{ik} [s-1]	E_i [cm-1]	E_k [cm-1	Term$_i$	J_i	Term$_k$	J_i
381.583970	$1.12 \cdot 10^8$	11976.239	38175.355	a 3F	4	y 3D°	3
382.042491	$6.67 \cdot 10^7$	6928.268	33095.941	a 5F	5	y 5D°	4
382.444329	$2.83 \cdot 10^6$	0.000	26140.179	a 5D	4	z 5D°	3
382.588058	$5.97 \cdot 10^7$	7376.764	33507.123	a 5F	4	y 5D°	3
382.782220	$1.05 \cdot 10^8$	12560.934	38678.039	a 3F	3	y 3D°	2

где λ - длина волны перехода, A_{ik} - скорость радиационного перехода, E_i, E_k -значения энергии нижнего и верхнего состояний, Term$_i$, Term$_k$ - идентификация соответствующего электронного состояния, J - квантовое число углового момента состояния.

В случае больцмановского распределения населенностей атомных состояний интенсивность линий в спектре излучения выражается формулой:

$$I_{ik} = c \cdot A_{ik} \cdot g_k \cdot exp(-E_k/kT) \quad (14)$$

где I_{ik}- интегральная интенсивность наблюдаемой линии, c – калибровочный коэффициент, A_{ik} - скорость радиационного перехода, $g_k = 2J_k + 1$ - кратность вырождения верхнего состояния, E_k- энергия верхнего состояния, k - постоянная Больцмана, T - температура. Из формулы 14 следует линейная зависимость логарифма интенсивности от энергии верхнего состояния перехода:

$$ln(I_{ik}/A_{ik}g_k) = -E_k/kT + ln(c) \quad (15)$$

Таким образом, наклон прямой равен $1/kT$ и не зависит от калибровочного коэффициента.

Как видно из Рисунка 12, с течением времени интенсивность излучения, которое можно отнести к излучению черного тела, падает. Это обусловлено расширением плазменного облака и радиационным охлаждением. Охлаждение приводит к заселению уровней энергии нейтральных атомов железа FeI и появлению достаточно узких линий переходов между его квантовыми состояниями (Рисунок 12). Линии железа в спектре лазерной плазмы наблюдались начиная с задержки строб-импульса относительно лазерного импульса более 5 нс.

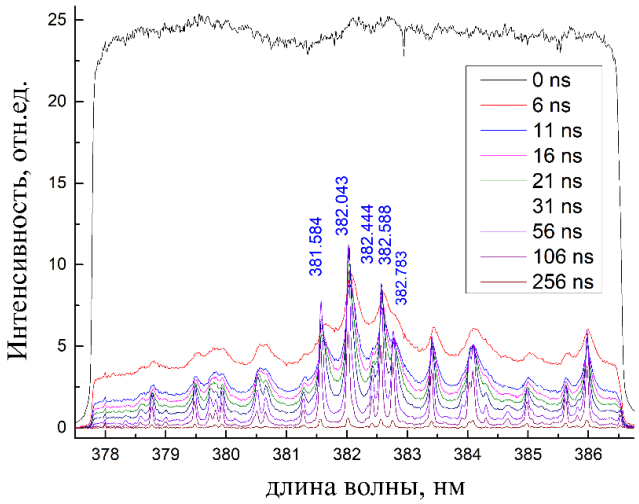

Рисунок 12 - Спектры лазерной плазмы вблизи 380 нм, для различных значений задержки между лазерным импульсом и стробом-импульсом.

На Рисунке 13 показана аппроксимация экспериментального спектра, зарегистрированного при задержке 21 нс, набором спектральных линий железа с лоренцовскими огибающими на фоне некого постоянного, не зависящего от длины волны уровня. По больцмановской зависимости, как показано на врезке на Рисунке 13, T = 1.4×10^4 K. Сравнивая уровень излучения черного тела при задержке строб-импульса 21 нс и 0 нс, можно получить оценку сразу после лазерного импульса T = 5×10^4 K. Следует отметить, что приведенная оценка может быть занижена в силу относительно большой длительности строб-импульса (5 нс), так как интенсивность излучения, соответствующая задержке 0 нс, на самом деле, является средней по времени излучения плазмы во временном окне длительностью 5 нс.

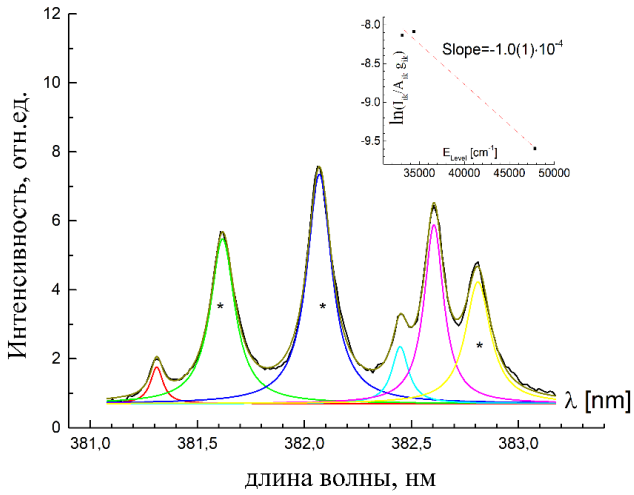

Рисунок 13 - Аппроксимация участка спектра и больцмановская зависимость для определения температуры из экспериментальных данных (на врезке).

Вторая серия измерений проведена в области 360 нм, где также наблюдались линии железа, идентифицированные по таблицам NIST [118]. В этом диапазоне не удалось найти изолированные линии железа с заметным различием по параметру E_k, что необходимо для определения температуры с помощью больцмановской зависимости. Из-за присутствия в спектре перекрывающихся линий с различающимися параметрами E_k пришлось провести прямое моделирование экспериментального спектра плазмы набором линий, описываемых выражением (*15*), используя температуру в качестве подгоночного параметра. В результате удалось оценить значение электронной температуры для начального времени T = 5.5×10^4 K. Таким образом, измерения, выполненные в двух спектральных интервалах, дают близкие значения начальной температуры плазмы 5.0×10^4 K и 5.5×10^4 K.

Длительность существования горячей плазмы, спектр излучения которой не содержит выраженных спектральных линий, составляет не более 5 нс. При задержках более 20 нс температура плазмы снижается до ~1.4×10^4 K. Спектральные линии атомов железа наблюдаются при задержках строб-импульса относительно лазерного импульса вплоть до 250 нс.

2.3 Поглощение УФ излучения в газах

Излучение полученной в эксперименте лазерная плазмы, которое аппроксимируется спектром излучения черного тела с температурой ~5.5×10^4 K, является источником жесткого УФ излучения, потока нейтральных и ионизированных атомов материала мишени и электронов [119]. Объем области, в которой происходит фотоионизация, определяется в первом приближении сечением поглощения УФ излучения. Так как в наших экспериментах концентрация аналитов всегда на 3-6 порядков меньше концентрации буферных газов, распространение УФ излучения в камере определяется именно этими газами.

При атмосферном давлении окружающего газа область существования плазмы ограничена полусферической ударной волной, распространяющейся на расстояние, сравнимое с диаметром лазерного пятна. Пучок ионов и нейтральных атомов мишени быстро рассеивается на частицах окружающего газа. Например, при рассеянии ионов серебра на аргоне сечение рассеяния составляет 1.3×10^{-16} см^2 [120,121]. Отсутствие их в масс-спектрах можно объяснить быстрой рекомбинацией с электронами в условиях атмосферного давления, поскольку константа рекомбинации линейно растет с давлением

Сечение упругого рассеяния электронов для энергий менее 200 эВ находятся в диапазоне 0.4-23.9×10^{-16} см^2 для аргона и 8.7-30.5×10^{-16} см^2 для азота [122,123], что также ограничивает распространение пучка электронов десятками микрон.

Можно предположить, что основным ионизирующим фактором при атмосферном давлении окружающего газа является жесткое УФ излучение лазерной плазмы, которое может распространяться на значительное расстояние от плазменного сгустка, вызывая ионизацию аналита как непосредственно, так и через вторичные реакции. На Рисунке 14 приведены спектральные зависимости сечения поглощения газов, используемых в эксперименте, построенные по данным [122–124].

Если представить излучение лазерно-индуцированной плазмы как излучение черного тела с температурой 5.5×10^4 K, то почти половина излучаемых им квантов имеют энергию, превышающую 15 эВ, что достаточно для ионизации как азота, аргона и воды, так и любых органических соединений. Однако распространение жесткого излучения ограничено поглощением в газе, поэтому размер области первичной ионизации зависит от состава газовой среды.

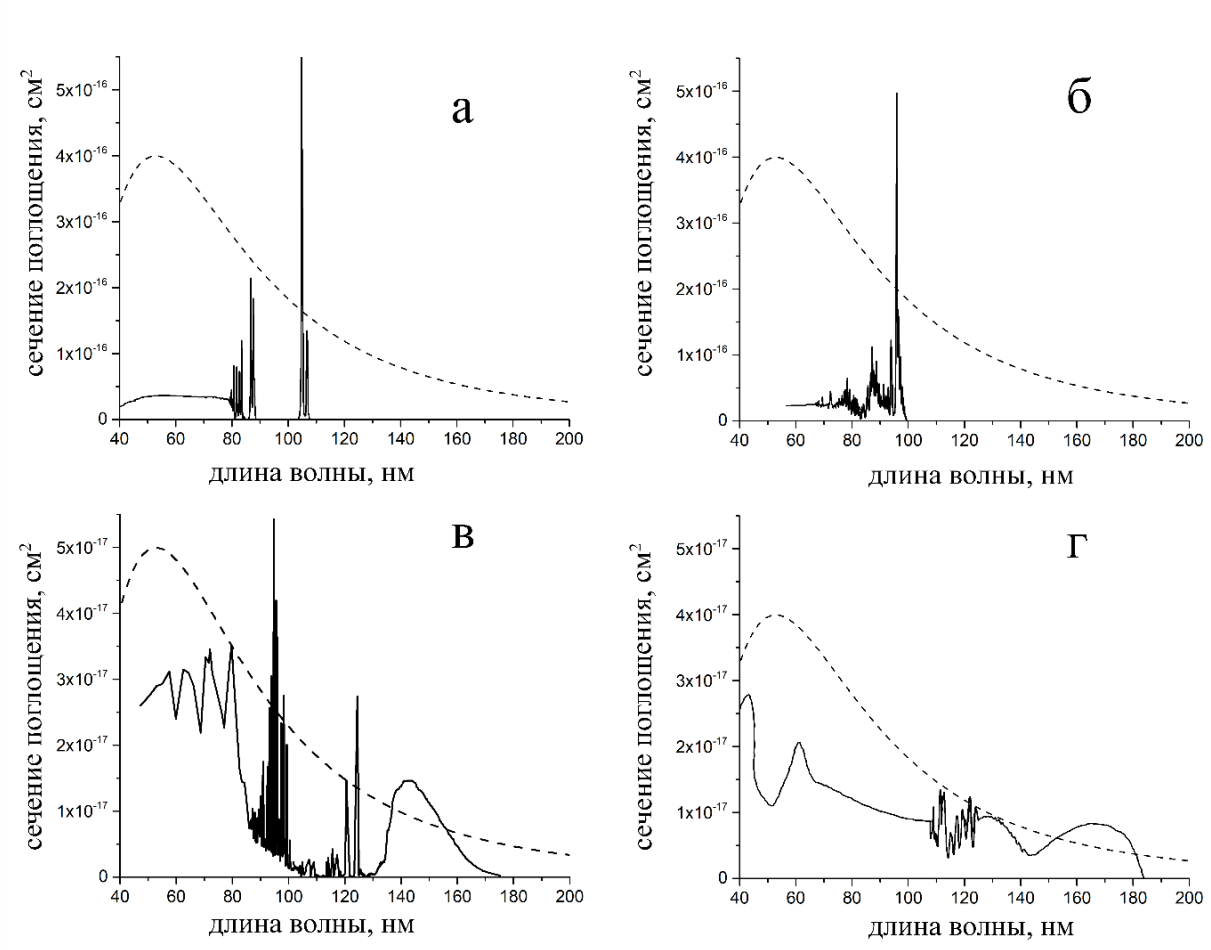

Рисунок 14 - Спектральная зависимость сечения поглощения: (а) аргона, (б) азота, (в) кислорода и (г) воды. На каждом графике показан спектр излучения черного тела при температуре 5.5×10^4 K (в относительных единицах)

Как видно из представленных на Рисунке 14 спектральных данных, для аргона существенное поглощение излучения наблюдается в области длин волн короче 80 нм (энергия фотона 15.45 эВ). В более длинноволновой области распространение излучения ограничено только концентрацией аналита и примесей (в основном воды) с сечением поглощения порядка 3×10^{-18} см^2. При концентрации паров воды в чистых газах (99.99%, 100 ppm) коэффициент поглощения составит около $3\times10^{19}\times10^{-4}\times3\times10^{-18} = 10^{-2}$ см$^{-1}$.

При использовании азота сильное поглощение наблюдается в области длин волн короче 120 нм (10.3 эВ). Сечение поглощения превышает 10^{-18} см^2, что ограничивает область распространения коротковолнового излучения при атмосферном давлении азота расстоянием в сотни микрон. В длинноволновой области спектра поглощение связано со слабыми полосами поглощения азота с сечением 10^{-21}-10^{-23} см^2 и с поглощением примесями. Поглощение на слабых полосах ограничивает распространение излучения на длину порядка нескольких сантиметров. Так как концентрация аналитов в эксперименте не превышала 10^{-6} (1 ppm), их присутствие практически не влияет на распределение излучения в камере ионизации. Излучение плазмы при распространении в азоте может ионизовать большинство органических соединений, но энергии квантов, которые могут распространяться в азоте, недостаточно для ионизации молекул воды.

При использовании высокочистого аргона (с чистотой 99,995) область, подвергающаяся засветке жестким УФ излучением с длиной волны более 90 нм (энергия кванта до 13.8 эВ), составляет несколько сантиметров, что сравнимо с размером камеры ионного источника. В этой области возможно образование как молекулярных ионов воды (потенциал ионизации 12.62 эВ [46]), так и молекулярных ионов аналитов путем однофотонной ионизации.

Лабораторный воздух поглощает излучение с длиной волны менее 180 нм (6,9 эВ) за счет поглощения молекулярным кислородом, парами воды и азотом. Так как сечение поглощения молекулярного кислорода в области длин волн короче 180 нм составляет порядка 10^{-17} см^2, коротковолновое излучение поглощается на длине в несколько десятков мкм, и весь объем камеры ионизации засвечивается излучением с длиной волны более 200 мкм, не приводящим к однофотонной ионизации молекул аналита и воды.

Таким образом, изменение состава газовой среды при атмосферном давлении приводит к изменению каналов ионизации за счет изменения спектрального состава ионизирующего излучения.

2.4 Зависимость ионного тока ионов аналита от частоты следования и энергии импульсов излучения лазера

Лазерная плазма является импульсным источником излучения, которое создает облако первичных ионов в газе, заполняющим ионный источник. Далее при движении облака в потоке газа к заборнику масс-спектрометра происходит изменение состава и количества ионов за счет рекомбинации и реакций с передачей заряда (Раздел 2.6). Ионы мишени, которые образуются непосредственно в лазерной плазме, не регистрируются в масс-спектрах, так как их распространение ограничено ударной волной и рекомбинацией в плотной плазме. Таким образом первичным процессом образования ионов является фотоионизация, количество первичных ионов связано с мощностью источника излучения, определяемой в проведенных экспериментах энергией лазерного импульса. Средний ионный ток при постоянной энергии импульса определяется частотой следования лазерных импульсов (средней мощностью излучения). Ограничения амплитуды ионного тока могут быть связаны как с процессом ионизации, так и с образованием объемного заряда на входе масс-спектрометра.

Для того чтобы оценить влияние изменения частоты и энергии излучения лазера, создающего лазерную плазму, на изменение ионного тока были проведены эксперименты по **Ошибка! Закладка не определена.**суммарной амплитуде которых измерялся ток аналита. Помимо ионов целевого соединения в камере присутствуют фоновые ионы, которые влияют на значение полного ионного тока, измеряемого как сумма всех пиков в масс-спектре.

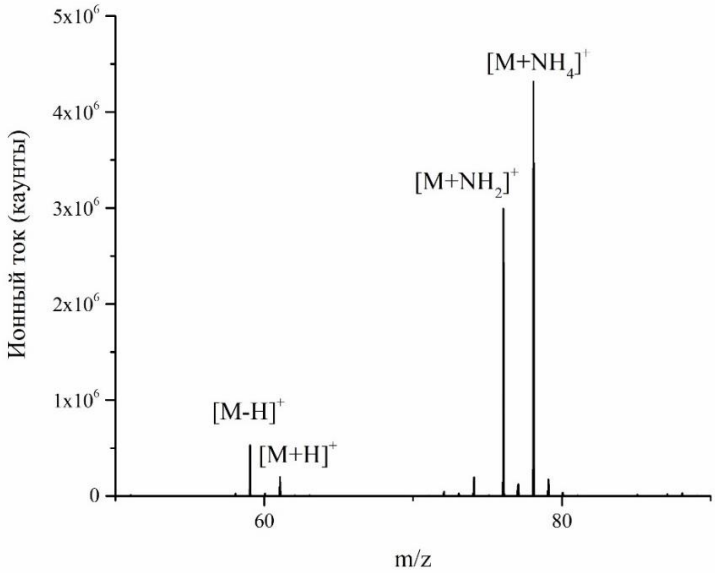

Рисунок 15 - Участок масс-спектра изопропилового спирта

На Рисунке 16 показана зависимость ионного тока аналита и полного ионного тока от энергии лазерных импульсов, создающих лазерную плазму. Шкала значений ионного сигнала

приведена в логарифмическом масштабе, а значения энергии в импульсе изменяются от 70 до 470 мДж, что соответствует плотности энергии излучения на мишени 2,5 – 16 Дж/см^2.

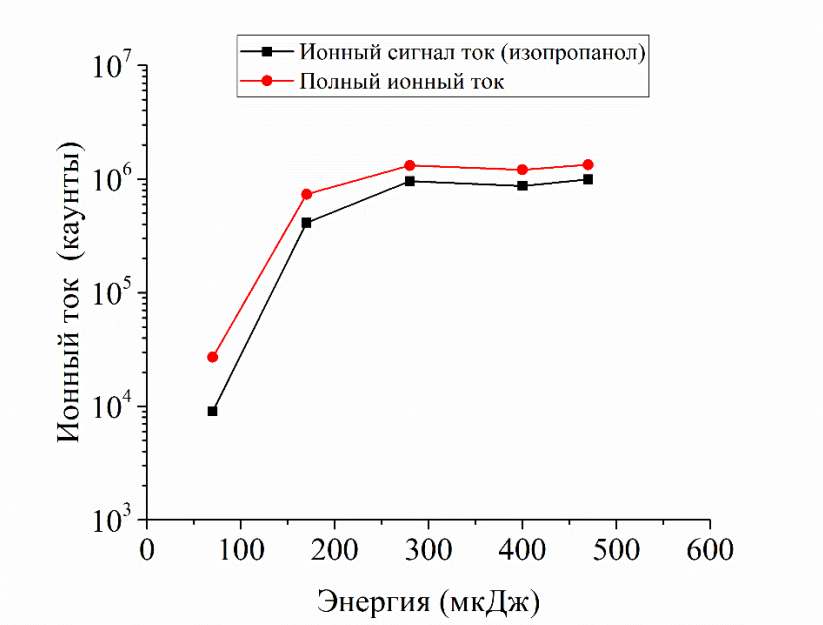

Рисунок 16 - Зависимость полного ионного тока и тока ионов изопропилового спирта от энергии импульса лазера.

Как видно из рисунка, выход ионов перестает зависеть от энергии лазерного импульса начиная с 200 мкДж, что соответствует плотности энергии на мишени 7 Дж/см^2. На начальном участке зависимости двукратное изменение энергии приводит к изменению ионного тока на 2 порядка, что затрудняет измерения. Насыщение зависимости выхода ионов аналита позволяет снизить влияние нестабильности плазмы на выход ионов и понизить порог обнаружения метода.

На Рисунке 17 представлен график изменения ионного тока аналита и полного ионного тока от частоты излучения лазера в аргоне. Поток аналита поддерживался постоянным $4 \cdot 10^{14}$ мол/сек. Из графика видно, что изменение частоты в диапазоне от 1 до 300 Гц приводит к практически линейному (коэффициенты наклона 0,92 и 0,90 для аргона и воздуха соответственно) увеличению ионного тока как аналита, так и полного ионного тока. Отметим, что выход ионов аналита в аргоне приблизительно на 2 порядка превышает выход ионов аналита в воздухе. Более подробно этот эффект, связанный с поглощением жесткого УФ излучения в воздухе, будет рассмотрен в разделе 2.8.

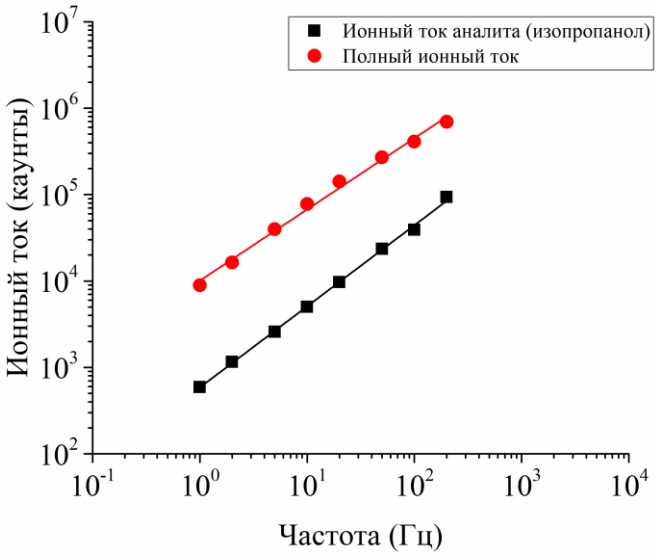

Рисунок 17 - Зависимость ионного тока ионов аналита (черные квадраты) и полного ионного тока (красные кружки) в потоке аргона от частоты следования лазерных импульсов

Проведенный эксперимент позволяет выбрать параметры излучения для создания плазмы в ионном источнике. Для обеспечения стабильности измерений плотность энергии лазерного излучения на металлической мишени должна составлять более 10 Дж/см^2. Линейная зависимость выхода ионов от частоты следования импульсов позволяет увеличивать ионный ток и соответственно снижать порог обнаружения прибора. Наилучшие результаты получены при частоте повторения импульсов 300 Гц, предельной для лазера, используемого в эксперименте.

2.5 Состав первичных ионов

Как было показано ранее [1], преобладающими реакциями, приводящими к образованию ионов аналитов при воздействии УФ излучения лазерной плазмы являются реакции передачи протона. Источником протона в этих реакциях является молекула воды, концентрация которой в реальных экспериментах превышает концентрацию аналитов на несколько порядков даже при использовании чистых газов.

Первичный канал образования достаточно очевиден. Импульсное УФ излучение с энергией кванта более 12.6 эВ приводит к образованию ионов H_2O^+ с концентрацией, превышающей концентрацию ионов аналитов на несколько порядков (предполагается, что при чистоте газа 99,995, концентрация паров воды может составлять десятки ppm), так как сечение фотоионизации молекулярных соединений довольно близки. Возможные реакции с участием молекул воды можно записать в следующем виде:

$$H_2O + h\nu = H_2O^+ \quad (16)$$

$$H_2O^+ + H_2O = H_3O^+ + OH \quad (17)$$

Широкополосное УФ излучение с длиной волны менее 239 нм может приводить к фотодиссоциации молекулы воды, так как это происходит в атмосфере Земли[125]. В присутствии жесткого УФ излучения образуются еще два типа протонодонорных агентов: OH^+ и H^+ с потенциалами ионизации 13 и 13.6 эВ соответственно.

$$H_2O + h\nu = OH + H \quad (18)$$

$$OH + h\nu = OH^+ + e \quad (19)$$

$$H + h\nu = H^+ + e \quad (20)$$

Сродство к протону атома кислорода 485 кДж/моль [46], поэтому ион-радикал OH^+ является наиболее эффективным протонодонорным соединением. Наличие свободных ионов H^+ может объяснить появление ионов N_2H^+, O_2H^+ и ArH^+. Энергия сродства к протону для этих веществ составляет 494, 421 и 369 кДж/моль соответственно [46].

При использовании гелия возможна ионизация H_2O^+ за счет эффекта Пеннинга. Однако в случае аргона этот канал становится неэффективным, так как энергия метастабильного уровня $^3P_2$ 11.6 эВ меньше потенциала ионизации молекулы воды 12.6 эВ [126].

На Рисунке 18 приведены масс-спектры, полученные при подаче в камеру ионизации лабораторного воздуха, азота и аргона. Доминирующими в масс-спектре при подаче воздуха являются пики с m/z 36.045 и 54.055, которые идентифицируются как ионы $(H_2O+NH_4)^+$ и $((H_2O)_2+NH_4)^+$ на Рисунке 18. Существенно меньшую интенсивность имеют пики ионов $((H_2O)_2+H_3O)^+$ и $((H_2O)_3+H_3O)^+$ с m/z 37.023 и 55.039, соответственно. Кроме того, масс-спектр содержит пик меньшей интенсивности с m/z 18.034, соответствующий ионам NH_4^+. Ионы аммония, а также его аддукты наблюдаются и при использовании ряда других методов ионизации при атмосферном давлении, например DART [11]. Одно из предположений состоит в том, что источником таких ионов является аммиак, присутствующий в воздухе как продукт жизнедеятельности живых организмов. Однако данные, приведенные на Рисунке 18, показывают, что ионы аммония регистрируются и в условиях ионизации в атмосфере азота, когда исключена возможность поступления в зону ионизации природного аммиака. Пики с m/z 36.045 и 54.055 $(H_2O+NH_4)^+$ и $((H_2O)_2+NH_4)^+$ также присутствуют в масс-спектре на Рисунке 18, но доминирующим является пик с m/z 35.061, соответствующий ионам $[NH_3+NH_4]^+$. При этом в спектре отсутствуют аддукты вида $[(H_2O)_n+H_3O]^+$. Представленные результаты свидетельствуют в пользу того, что аммиак синтезируется в условиях APLPI. Возможными реагентами являются N_2 и H_2O. Известно, например, что при электрическом разряде в азоте наблюдаются атомы N (4S) в основном состоянии, а также метастабильные атомы N (2D) и N (2P)[127]. Атомы азота, образующиеся в результате диссоциации молекул N_2, могут затем вступать в реакцию с молекулами воды с образованием, в конечном счете, молекул аммиака. В масс-спектре,

зарегистрированном в атмосфере аргона, доминируют пики $[(H_2O)_2+H_3O]^+$ и $[(H_2O)_3+H_3O]^+$, очевидно, обусловленные остаточным давлением паров воды, в то время как интенсивность аддуктов с аммонием вида $[(H_2O)_n+NH_4]^+$ мала. В масс-спектре также появляется пик H_3O^+. Его образование может быть связано с эффективной ионизацией молекул воды жестким УФ излучением, распространение которого не ограничено поглощением буферного газа.

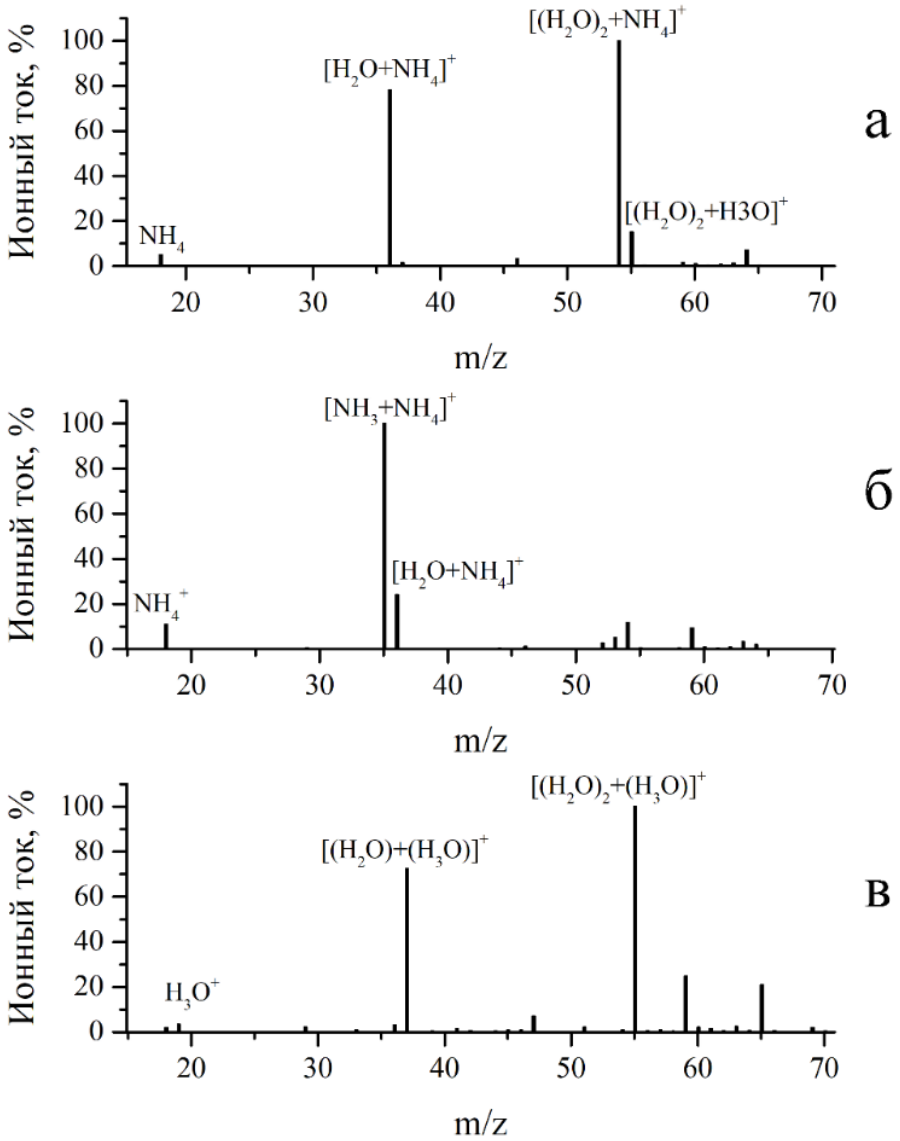

Рисунок 18 - Масс-спектры газовых сред: а – воздух, б – азот, в - аргон

В потоке ионов обнаруживаются также ионы Ar^+, ArH^+, O_2^+, O_2H^+, N_2^+, N_2H+ H_2O^+ амплитуда пиков которых значительно меньше пиков протонированных молекул воды и кластеров. В качестве примера, на Рисунке 19 приведен участок масс-спектра среды аргона. Амплитуда пиков ArH^+, O_2H^+, N_2H^+ превышает амплитуду пиков соответствующих молекулярных ионов и иона аргона. В спектре также наблюдается протонированная молекула аммиака NH_4.

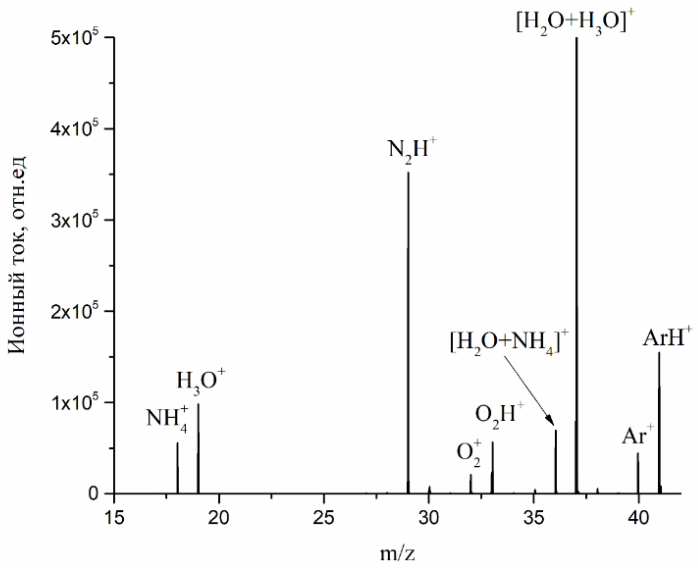

Рисунок 19 - Участок масс-спектра среды при подаче в область ионизации аргона

Доминирующими пиками в отсутствии аналита являются пики ионов $[H_2O + H_3O]^+$ и $[(H_2O)_2 + H_3O]^+$ источником формирования которых, очевидно, является ион H_2O^+. Кроме этих пиков в спектре наблюдается ряд пиков меньшей интенсивности, представляющих интерес для понимания процесса образования ионов. Это ионы N_2^+, O_2^+ и Ar^+, и протонированные ионы N_2H^+, O_2H^+ и ArH^+. Кислород и азот присутствуют в аргоне в качестве примесей с концентрацией в десятки ppm. Образование молекулярных ионов азота и кислорода и иона аргона связано с фотоионизацией соответствующих веществ жестким УФ излучением. Спектр УФ излучения, распространяющегося в камере ионизации, ограничен поглощением аргона (80 нм, энергия кванта 15.45 eV), поэтому фотоионизация кислорода, азота и воды возможна. Концентрация паров воды в аргоне как минимум на 3 порядка превышает концентрацию регистрируемых аналитов

В масс-спектрометрии PTR и SIFT образование ион реагентов происходит в специальной камере, а собственно процесс ионизации аналита - в дрейфовой трубе. Эти процессы разделены в пространстве. Фотоионизация и последующее образование протонодонорных соединений при использовании излучения лазерной плазмы происходит непосредственно в газе, содержащем детектируемые соединения. Это делает возможным одновременное протекание нескольких реакций, приводящих к получению целевых ионов. Результатом этого должно быть выравнивание эффективности образования ионов соединений с различным сродством к протону, что и необходимо для анализа широкого спектра ЛОС, выделяемых живыми организмами.

2.6 Влияние времени дрейфа в плотном газе на состав регистрируемых ионов

Как было показано выше, область ионизации, в которой образуются первичные ионы, зависит от состава буферного газа в камере ионизации. В первую очередь это определяется условиями распространения УФ излучения лазерной плазмы. Ионы аналитов, как правило, продукты вторичных реакций, основной из которых является реакция передачи протона. Как видно из Рисунка 9 и Рисунка 10, движение ионов происходит в потоке буферного газа с переменной скоростью и плотностью ионов, что затрудняет определение влияния вторичных процессов на состав регистрируемых ионов. Процессом, уменьшающим количество ионов, является электрон-ионная рекомбинация. Рекомбинация — это процесс, обратный ионизации, который состоит в захвате ионом свободного электрона. Для качественного определения влияния вторичных процессов можно провести измерения, изменяя время пребывания ионов в плотном газе. Для этого была использована схема ионного источника, показанная на Рисунке 20.

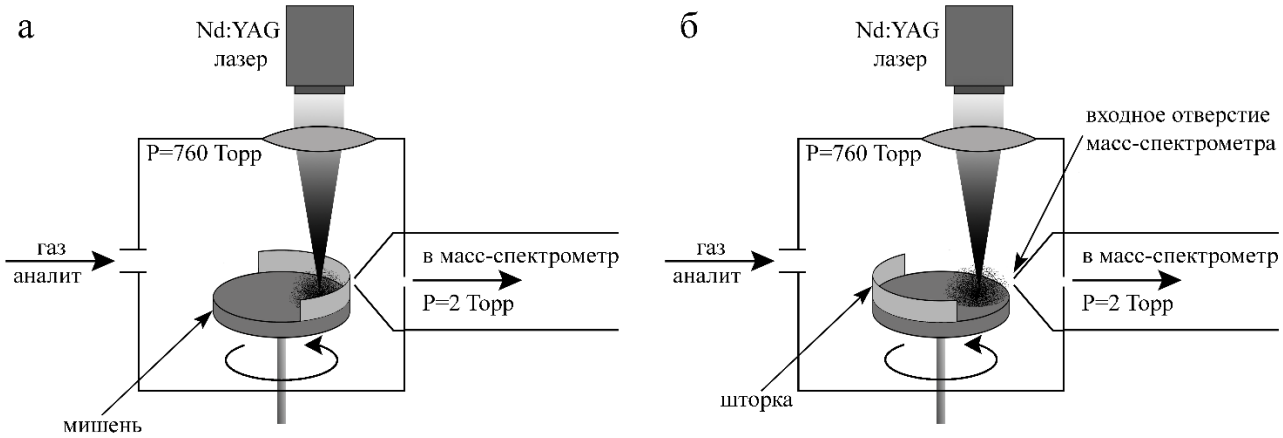

Рисунок 20 – Схема ионного источника: а –камера ионизации масс-спектрометра со шторкой, закрывающей излучение плазмы, б - камера ионизации масс-спектрометра со шторкой не закрывающей излучение лазерной плазмы

В камеру подавался аргон (99,995), поток которого устанавливался равным потоку на входе масс-спектрометра, то есть весь газ, поступающий в камеру, попадал в масс-спектрометр. Аналиты вводились в поток газа через кварцевый капилляр диаметром 30 мкм и длиной 1 метр.

Для исследования процессов ионизации на вращающуюся мишень, на поверхности которой создавалась лазерная плазма, была установлена шторка из титановой фольги высотой 3 мм. Лазерная плазма создавалась на расстоянии 3 мм от входного отверстия масс-спектрометра. При вращении мишени, когда шторка оказывалась между плазмой и входным отверстием масс-спектрометра, излучение плазмы не попадало на входное отверстие. Это приводило к увеличению длины пути ионов, образующихся в газе. В то же время шторка не влияла на общий

поток газа, так как поток газа на входе был точно равен потоку газа через входное отверстие масс-спектрометра и составлял 5 $см^3$/сек. После поворота шторки на 180° излучение плазмы попадало на входное отверстие масс-спектрометра, что позволяло регистрировать ионы, формируемые непосредственно перед входным отверстием заборника.

В отсутствие аналитов при положении шторки, обеспечивающем засветку входного отверстия масс-спектрометра, состав ионов определяется в основном протонированными молекулами воды H_3O^+ и протонированными водяными кластерами.

На Рисунке 21 приведены зависимость полного ионного тока, регистрируемого масс-спектрометром, от времени при вращающейся вместе с мишенью шторке и масс-спектры, полученные при подаче в камеру паров этилового спирта C_2H_5OH (m/z 46), триэтиламина (m/z 101) и метилэтаноламина C_3H_9NO (m/z 75). Поток аналитов составлял потоком порядка $2\text{-}4\cdot10^{11}$ $с^{-1}$. Как видно из Рисунка 21 А, полный ионный ток максимален, когда шторка не экранирует входное отверстие масс-спектрометра от излучения плазмы. При положении шторки между лазерной плазмой и заборником масс-спектрометра общий ионный ток падает приблизительно в 12 раз.

Сравнение масс-спектров показывает, что помещение шторки между лазерной плазмой и входным отверстием масс-спектрометра по-разному влияет на амплитуды пиков, соответствующие различным соединениям. При открытой шторке в масс-спектре основными пиками являются пики протонированых молекул воды (m/z 19), и водяных кластеров $(H_2O)_nH+$ (m/z 37, 55), протонированные молекулы спирта (m/z 47) и протонированные молекулы аминов (m/z 102, m/z 76). После поворота шторки, закрывающей прямой поток излучения плазмы на входное отверстие масс-спектрометра и увеличивающей время движения ионов из области ионизации до входного отверстия масс-спектрометра, в масс-спектрах практически исчезают пики связанные с молекулами воды, а пик протонированных молекул спирта (m/z 47) падает приблизительно в 50 раз. В то же время пики соответствующие протонированным молекулам аминов (m/z 102, m/z 76) снижаются по амплитуде приблизительно в 10 раз.

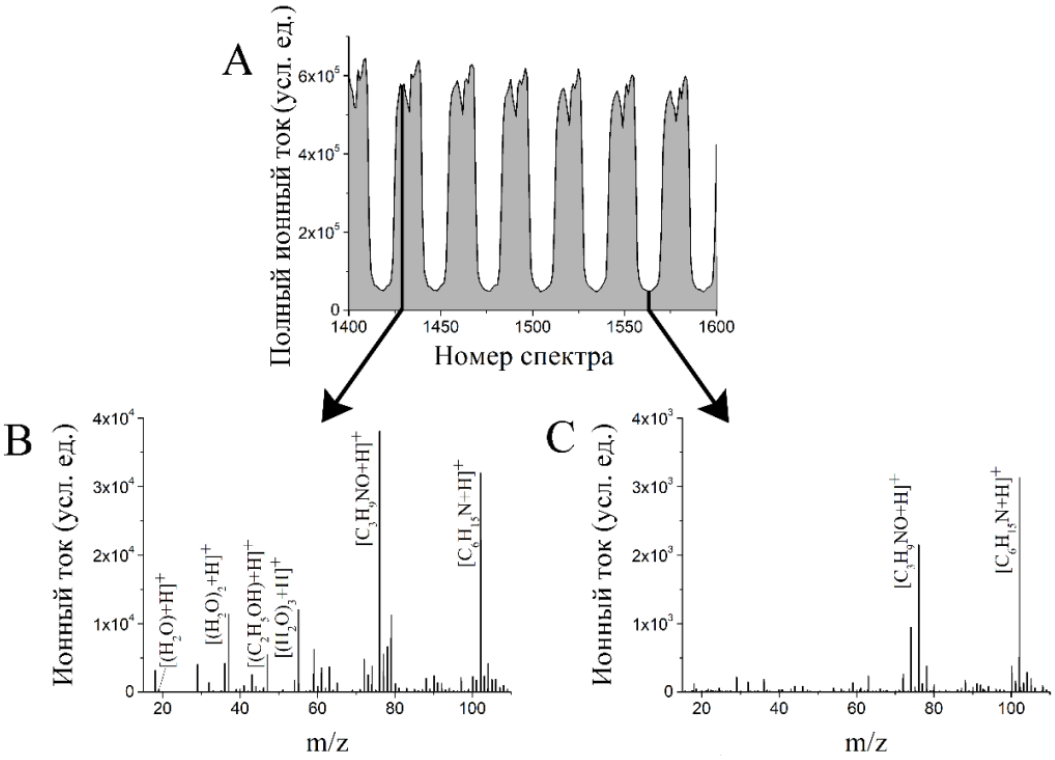

Рисунок 21 - Зависимость полного ионного тока от времени при вращающейся мишенью со шторкой и масс-спектры: А – полный ионный ток, регистрируемый масс-спектрометром при вращении шторки, В – масс-спектр при открытой шторке и потоке молекул аналитов 10^{11} c^{-1}, С – масс-спектр при закрытой шторке потоке молекул аналитов 10^{11} c^{-1}

Изменение масс-спектров при повороте шторки, экранирующей входное отверстие масс-спектрометра от излучения плазмы, связано с несколькими процессами. Процесс электрон – ионной рекомбинации при увеличении времени движения ионов в потоке газа приводит к общему падению ионного тока, но он не должен приводить к сильному изменению соотношения амплитуд пиков. Наблюдаемое резкое нарушение соотношения количества протонированных ионов высокоосновных и низкоосновных соединений при увеличении пути дрейфа ионов, по-видимому, связано с реакциями передачи протона от протонированных молекул с низкой основностью к молекулам с высокой основностью. Этот процесс частично компенсирует процесс электрон-ионной рекомбинации, что и приводит к резкому перераспределению интенсивности пиков в масс-спектре. Для подавления этого процесса необходимо резко ограничить длину пути движения иона в плотном газе. Как было отмечено выше, размер излучающей жесткое УФ излучение лазерной плазмы составляет десятки мкм, что позволяет разместить ее непосредственно перед входным отверстием масс-спектрометра [128].

2.7 Образование ионов аналитов в ионном источнике APLPI

Для выяснения механизма ионизации и выбора оптимальных условий анализа представляется важным исследовать ионизационные способности метода APLPI в различных газовых средах при определении индивидуальных соединений с различными физико-химическими свойствами были проведены эксперименты с тестовыми соединениями.

Для выяснения механизма ионизации и выбора оптимальных условий анализа представляется важным исследовать ионизационные возможности метода APLPI в различных газовых средах при определении индивидуальных соединений с различными физико-химическими свойствами. В качестве тестовых соединений в работе изучены органические растворители, отличающиеся значениями энергии сродства к протону, потенциалом ионизации и спектром поглощения излучения. Особенности ионизации этих соединений исследованы в атмосфере азота, аргона и лабораторного воздуха.

Схема экспериментальной установки приведена на Рисунке 22. Перед заборником масс-анализатора (1) установлена герметичная камера образца, находящаяся при атмосферном давлении и снабженная окнами для ввода лазерного излучения. В камеру через патрубки подаются газы (азот 99.999, аргон 99.995 или воздух). Поток газа регулировался так, чтобы в камере поддерживалось давление, на 3-30 Торр ниже или выше атмосферного. Диаметр входной диафрагмы масс-спектрометра 300 мкм обеспечивал поток воздуха при атмосферном давлении на входе прибора 7 см^3/сек

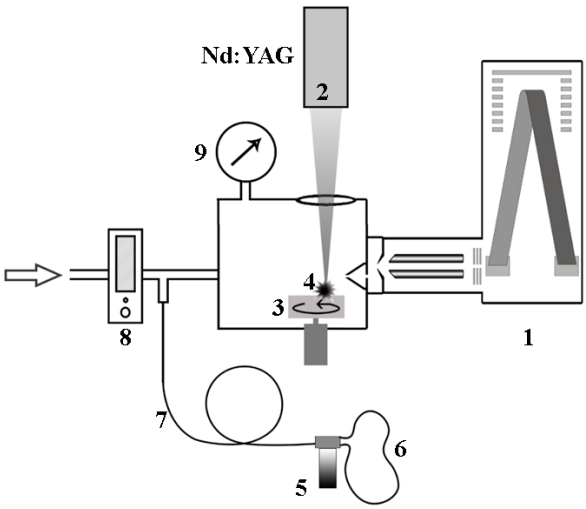

Рисунок 22 - Схема экспериментальной установки: 1 – масс-спектрометр, 2 - Nd:YAG лазер, 3 – вращающаяся металлическая мишень, 4 – лазерная плазма, 5 – ампула с аналитом, 6 – резервуар с мягкими стенками, 7 – кварцевый капилляр, 8 – ротаметр, 9 - манометр

Анализируемые вещества подавались в камеру ионизации с потоком газа-носителя через кварцевый капилляр (7) с внутренним диаметром 100 мкм и длиной один метр, выход которого открывался в газовую магистраль вблизи ввода в камеру ионизации. Расход газа носителя при помощи ротаметра BronkhorstMV-304 (8) устанавливался равным скорости забора газа масс-спектрометром. На входе капилляра была установлена ампула с аналитом (5) и отдельным резервуаром с мягкими стенками (6), заполненным газом-носителем, что обеспечивало давление, равное атмосферному в ампуле и на входном срезе капилляра. Перенос аналита в камеру ионизации осуществлялся потоком газа-носителя путем создания разрежения в камере ионизации и, таким образом, создания перепада давлений на длине капилляра. Поток вещества рассчитывался исходя из предположения, что в ампуле создается давление насыщенных паров аналита. Перепад давления между ампулой с анализируемым веществом и камерой ионизации, измерялся манометром (9) и поддерживался неизменным в течение эксперимента. Расход газа носителя через капилляр определялся по формуле Пуазейля:

$$Q = \frac{\pi d^4}{128\eta l}(p_1 - p_2), \qquad (21)$$

где $(p_1 - p_2)$ — перепад давления на концах трубы, Па; Q — объёмный расход газа, м³/с; d — диаметр капилляра, м; η — коэффициент динамической вязкости, Па·с; l — длина трубы м. В условиях эксперимента он составлял $3\cdot10^{-4}$–10^{-2} см^3/сек. В предположении постоянного давления насыщенных паров в ампуле с аналитом, поток подаваемого в камеру аналита определялся как

$$N = 2 \cdot 2{,}7 \cdot e19 \cdot \frac{Pa}{Po} \cdot Q \qquad (22)$$

где Pa – атмосферное давление, Па, Po - давление в камере, Па, $2{,}7\cdot10^{19}$ количество молекул в кубическом сантиметре при атмосферном давлении, и составлял 10^{14}-10^{16} мол/сек.

В зависимости от химических свойств органических соединений, в условиях APLPI регистрируются различные виды ионов аналитов. Можно выделить следующие основные каналы ионизации исследованных соединений.

Ионизация передачей протона

Ионизация путем протонирования молекул аналита наблюдалась для всех исследованных соединений, за исключением предельных углеводородов. Как и следовало ожидать, доля ионов $[M+H]^+$ в ионном сигнале аналита возрастала с увеличением основностью в газовой фазе (gas-phase basicity, GB) соединения. Например, для триэтиламина (GB=951 кДж/моль [46]) этот канал ионизации является доминирующим во всех газовых средах. Для анилина (GB=850.6 кДж/моль [46]) пик $[M+H]^+$ является основным только в атмосфере аргона, в то время как в воздухе и азоте вероятность протонирования сравнима с вероятностью ионизации с образования аддуктов. Масс-

спектры анилина приведены на Рисунке 23. Для амилового эфира уксусной кислоты (GB = 837,7 кДж/моль[129]) доминирующими пиками во всех газовых средах являются пики аддуктов. В масс-спектрах большинства исследованных соединений при высоких концентрациях наряду с протонированными молекулами наблюдались ионы $[2M+H]^+$, соответствующие протонированным димерам. В этом случае доля сигнала $[2M+H]^+$ в общем ионном токе соединения зависит от количества регистрируемого соединения, поступающего в газовую фазу в единицу времени [130,131].

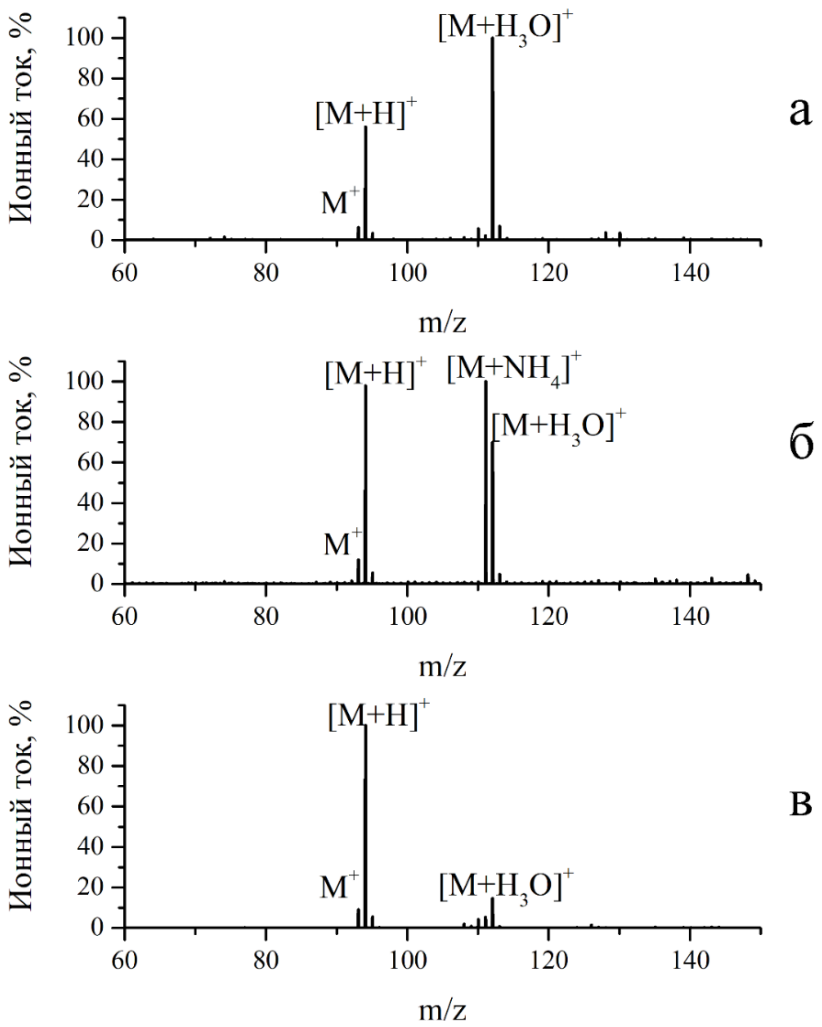

Рисунок 23 - Масс-спектры анилина зарегистрированные в (а) воздухе, (б) азоте и (в) аргоне

Реакция электрофильного присоединений

Второй канал ионизации основан на реакциях электрофильного присоединения и является основным для исследованных соединений со средней величиной основности, имеющих в своем составе электроотрицательный гетероатом. Два основных вида аддуктов регистрировались в

масс-спектрах: $[M+NH_4]^+$ и $[M+H_3O]^+$. При ионизации в воздухе для кислородсодержащих соединений (спиртов, эфиров, кетонов и карбоновых кислот) характерно образование аддуктов с аммонием $[M+NH_4]^+$, для азотсодержащих соединений (анилина, пиридина) более вероятно образование аддуктов с гидроксонием $[M+H_3O]^+$. Как и в случае ионизацией передачей протона, в масс-спектрах многих соединений при высоких концентрациях аналита регистрируются аддукты димеров состава $[2M+NH_4]^+$ и $[2M+H_3O]^+$. В качестве примера на Рисунке 24 приведен масс-спектр амилового эфира уксусной кислоты в различных газовых средах.

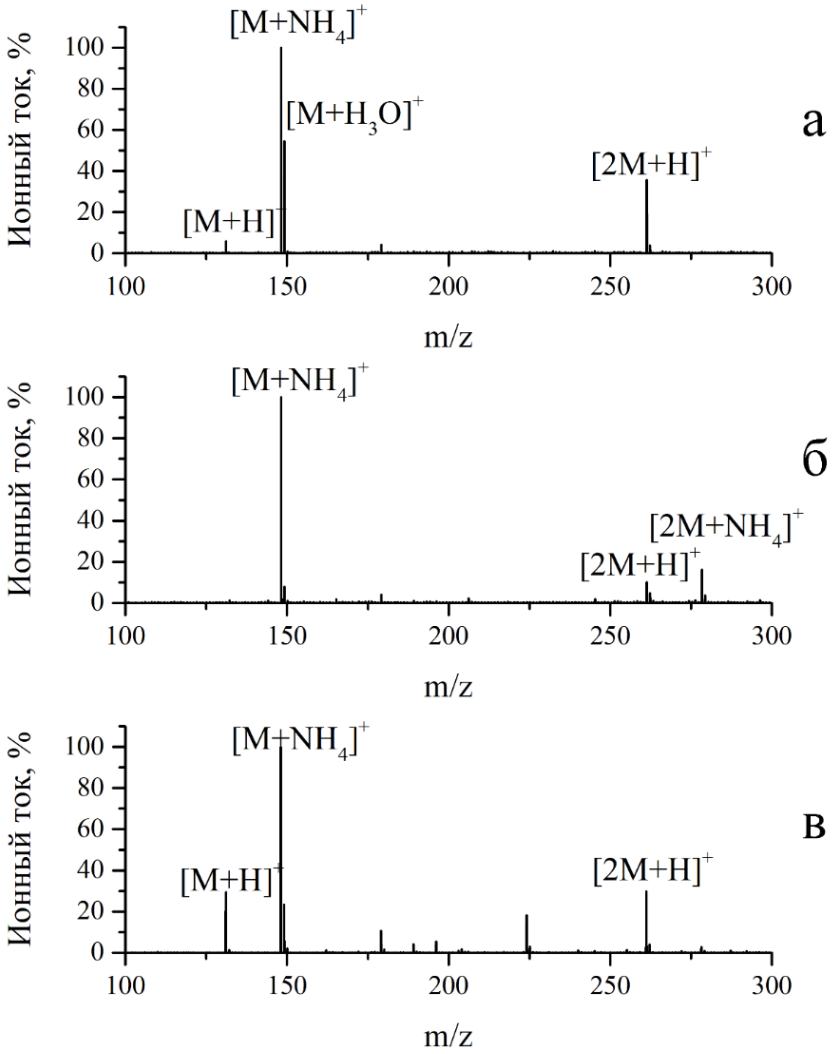

Рисунок 24 - Масс-спектры амилового эфира уксусной кислоты, зарегистрированные в (а) воздухе, (б) азоте и (в) аргоне

Фотоионизация

Третий канал ионизации приводит к образованию молекулярных ионов M^+. Среди изученных соединений такие ионы наблюдались при определении ароматических соединений – анилина, бензола и толуола. Масс-спектры толуола в различных газовых средах приведены на

Рисунке 25. Для ароматических углеводородов молекулярные ионы доминируют в масс-спектрах, зарегистрированных в инертных газах. Однако при проведении анализа в воздухе эти пики малы, а спектры содержат, главным образом, ионы окисленных молекул. Наиболее вероятным механизмом образования молекулярных ионов представляется фотоионизация. Как отмечено ранее, спектр излучения лазерной плазмы содержит кванты с энергией, достаточной для ионизации любых органических молекул. Но в условиях многочисленных столкновений «выживают» только ионы, содержащие в своем составе такие устойчивые группировки, как бензольное кольцо. Дополнительную стабилизацию молекулярных ионов обеспечивают электронодонорные заместители, способствующие увеличению электронной плотности в бензольном кольце, например, аминогруппа в анилине.

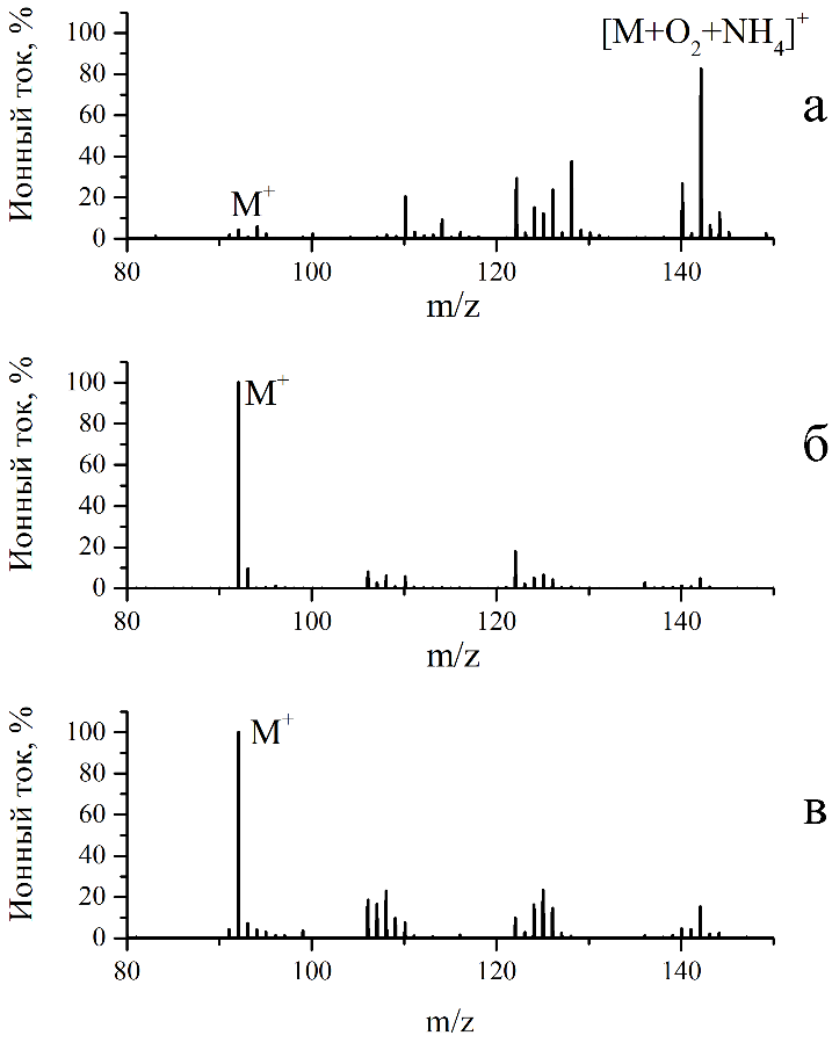

Рисунок 25 - Масс-спектры толуола в зарегистрированные в (а) воздухе, (б) азоте и (в) аргоне

Окисление и постионизация

Для исследованных неполярных соединений, таких как ароматические и насыщенные углеводороды, характерны сложные масс-спектры, в которых доминируют пики ионов окисленных молекул во всех газовых средах. Для насыщенных углеводородов наблюдаются ионы состава $[M\text{-}H_{2n}+O_m+H]^+$ и $[M\text{-}H_{2n}+O_m+NH_4]^+$, n=1; 2, m =1; 2; 3. Например, в масс-спектре n-гексана в воздухе (Рисунок 26) регистрируются пики $[M\text{-}H_4+O+H]^+$ с m/z 99.080, $[M\text{-}H_4+O+NH_4]^+$ с m/z 116.107, $[M\text{-}H_2+O_2+H]^+$ с m/z 117.092, $[M\text{-}H_2+O+NH_4]+$ с m/z 118.121, $[M\text{-}H_2+O_2+NH_4]^+$ с m/z 134.118. Окисление предельных углеводоров приводит к увеличению их сродства к протону. Таким образом, ионизация неполярных соединений в условиях лазерной плазмы основана на предварительном окислении молекул аналита и последующей ионизации путем реакций протонирования или присоединения.

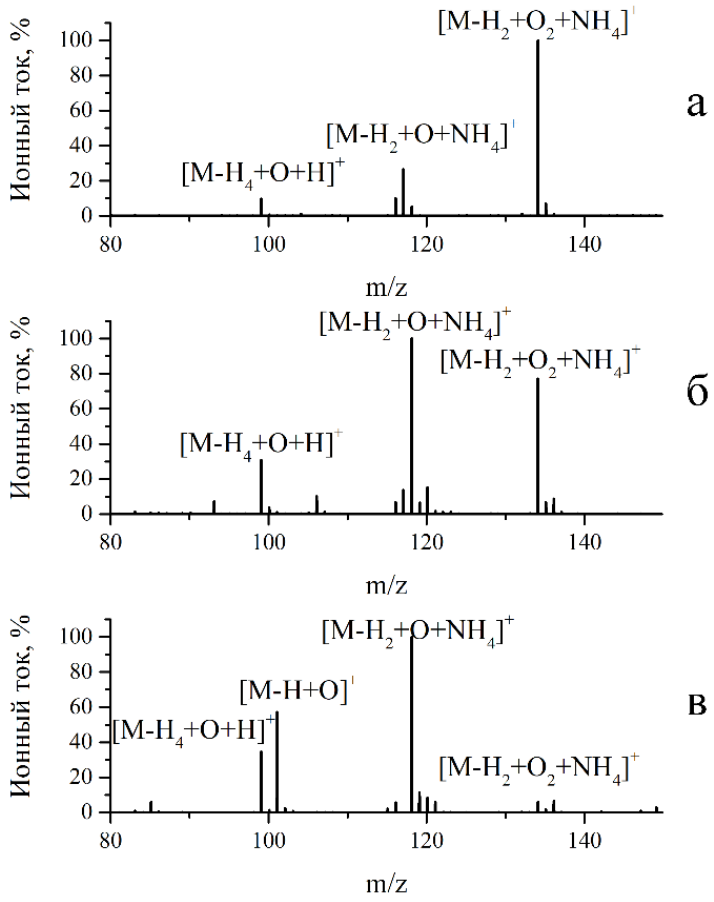

Рисунок 26 - Масс-спектры гексана в зарегистрированные в (а) воздухе, (б) азоте и (в) аргоне

Одна из возможных причин наличия высокого количества кластерных ионов в масс-спектре связано с образованием сверхзвуковой струи. Сверхзвуковая струя образуется из-за перепада давления между атмосферным давлением в камере и за соплом (заборником масс-спектрометра), где давление 2 Тора [132].

2.8 Сравнение относительной эффективности ионизации в различных газовых средах

Результаты сравнительного исследования эффективности ионизации органических соединений в воздухе, азоте и аргоне представлены в Таблице 3. Сравнение проводилось в идентичных условиях, поддерживая для каждого соединения одинаковое значение потока аналита в ионный источник, когда изменялся состав газа. За единицу принимали эффективность ионизации в атмосфере аргона, а ионный ток определяли как сумму площадей под всеми пиками в масс-спектре, связанными с регистрируемым соединением. Из приведенных данных следует, что значения ионных сигналов аналитов существенно различаются в разных газовых средах. Минимальная эффективность ионизации была получена на воздухе, максимальная - в аргоне [133]. Как уже упоминалось выше, это различие, вероятно, связано с особенностями распространения ультрафиолетового излучения в разных средах. Дополнительным преимуществом аргона по сравнению с атмосферным воздухом может быть значительное снижение матричных эффектов [134].

Таблица 3 Сравнение относительной эффективности ионизации в различных газовых средах

Аналиты	Относительная эффективность ионизации			IE, эВ	PA, кДж/моль [46]
	В аргоне	В азоте	В воздухе		
Гексан	1	0.60	0.23	10.2	
Ацетон	1	0.18	0.10	9.7	812
Пиридин	1	0.02	0.01	9.26	930
Толуол	1	0.02	0.04	8.8	784
N-пентил ацетат	1	0.004	0.02	-	~860
Анилин	1	0.03	0.02	7.7	882
Ацетонитрил	1	0.75	0.39	12.2	779
ДМФА	1	0.14	0.41	9.13	887
Трет-бутанол	1	0.32	0.49	9.9	802
Изобутанол	1	0.28	0.41	10.2	793
Триэтиламин	1	0.32	0.66	7.53	981

2.9 Определение чувствительности, порогов обнаружения и вероятности ионизации

Для определения чувствительности и порогов обнаружения необходимо обеспечить контролируемое изменение потока аналитов в камере ионизации. Для этого, как было показано выше, использовалось изменение потока газа через капилляр при изменении перепада давления на нем. Но при этом изменяется давление в камере ионизации, что может привести к изменению ионного сигнала как за счет изменения условий ионизации, так и за счет изменения потока через заборник масс-спектрометра.

Вторая проблема возникает при измерении вероятности ионизации аналитов. Для ее определения необходимо знать «прозрачность» или коэффициент пропускания масс-спектрометра. Эта величина не определяется расчётным путем и требует специального эксперимента.

2.10 Зависимость выхода ионов от давления в камере ионизации

Прежде всего, требовалось провести эксперимент, позволяющий оценить влияние давления в камере на эффективность ионизации. Схема экспериментальной установки в основном аналогична описанной ранее и приведённой на Рисунке 22. В камеру через патрубки подавался газ (азот 99.99, аргон 99.99 или воздух). Расход газа устанавливался при помощи ротаметра Bronkhorst MV-304. Давление в камере ионизации изменялось в пределах от 300 до 750 торр. В баллон, объемом 5 литров и заполненным аргоном при давлении 10^6 Па, внесено шприцом 5 мл насыщенных паров этанола. Газ с аналитом из баллона подавались в камеру ионизации через капилляр длиной 0,6 метров и диаметром 30 мкм. Экспериментально измеренный расход газа с аналитом из баллона через капилляр $8\cdot10^{-3}$см^3.Число молекул аналита в кубическом сантиметре было определено из соотношения:

$$N_{\text{см}^3} = \frac{P_{\text{нас}}}{P_{A\text{атм}}} N_L = \frac{44}{760} \cdot 2{,}7 \cdot 10^{19} = 1{,}6*10^{18} \text{ молекул спирта,} \qquad (23)$$

где N_L - число Лошмидта, $N_L = 2.7\times10^{19}$ см$^{-3}$; $P_{нас}$ – давление насыщенных паров аналита, Па; $P_{атм}$ - атмосферное давление при нормальных условиях, $P_{атм}$ = 101325 Па. В баллон было внесено 5 мл нас паров спирта, всего частиц аналита в баллоне рассчитывалось по формуле:

$$N_{\text{полн}} = 5 \cdot 1{,}6 \cdot 10^{18} = 8 \cdot 10^{18} \text{ молекул спирта внесено в баллон,} \qquad (24)$$

В одном кубическом сантиметре смеси в баллоне:

$$\frac{N_{\text{полн}}}{V} = \frac{8\cdot10^{18}}{5\cdot10^{3}} = 1{,}6 \cdot 10^{15} \text{молекул в см}^3, \qquad (25)$$

$$Q = 0{,}1 \cdot 8 \cdot 10^{-3} \cdot 1{,}6 \cdot 10^{15} = 1{,}28\cdot10^{12} \text{ молекул в секунду.} \qquad (26)$$

На Рисунке 27 приведена зависимость полного тока ионов этанола от давления в камере ионизации.

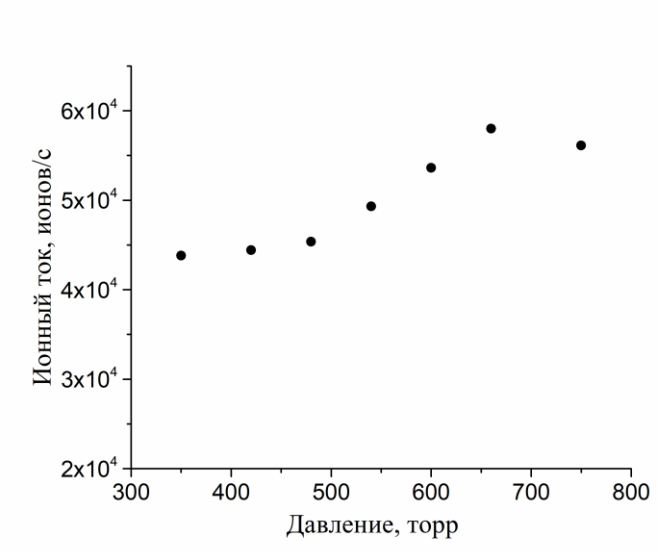

Рисунок 27 – Зависимость полного ионного тока этанола от давления в камере ионизации.

Эксперимент показал, что в интересующем нас диапазоне давления 660-760 Торр зависимость эффективности ионизации незначительна [135].

2.11 Эксперименты по определению характеристик метода

Чувствительность для метода APLPI для ЛОС можно определить как отношение суммарного ионного сигнала соединения, включая фрагменты и ионы с аддуктами, к числу внесенных в камеру молекулам вещества. Схема экспериментальной установки для определения чувствительности и пределов обнаружения метода приведена на Рисунке 22. Была изменена система подачи аналита. Для того, чтобы обеспечить малые потоки исследуемых соединений была применена следующая схема.

В камеру через патрубки подавался газ (азот 99.99, аргон 99.99 или воздух). При атмосферном давлении в камере расход газа через заборник масс-анализатора составлял около 7 $см^3$/сек. Аналиты подавались в ионизационную камеру из смеси с газом из резервуара, объемом 5-9 литров, через кварцевый капилляр с внутренним диаметром 30 мкм и длиной 1 метр. Один из концов капилляра располагался в близи области ионизации. С помощью ротаметра Bronkhorst MV-304 расход газа задавали так чтобы создавать в камере масс-спектрометра с резервуаром перепад давления в диапазоне от 3х до 100 Торр. Аналит переносился в ионизационную камеру потоком газа-носителя путем откачки ионизационной камеры и, таким образом, создавая перепад давления вдоль капилляра. Разность давлений Δp между резервуаром с аналитом и ионизационной камерой измерялась манометром и поддерживалась постоянной во время

эксперимента. Расход газа-носителя через капилляр рассчитывали по уравнению Хагена-Пуазейля:

$$Q = \frac{\pi d^4}{128\eta l}\Delta p, \qquad (27)$$

где Δp - перепад давления между концами капилляра, Па; Q - объемный расход газа, м3 / с; d - внутренний диаметр капилляра, м; η - динамическая вязкость газа-носителя, Па · с; l - длина капилляра, м. В предположении постоянного давления насыщенных паров в ампуле аналита Общий поток аналита N (в молекулах в секунду) через капилляр в ионизационную камеру был определен как:

$$N = N_L y_a Q, \qquad (28)$$

где N_L - постоянная Лошмидта, $N_L = 2{,}7 \times 10^{19}$ см$^{-3}$; y_a- мольная доля вещества исследуемого аналита.

Для расчета мольной доли, т.е. отношения количества вещества к общему количеству всех веществ, содержащихся в смеси:

$$y_a = \frac{n_a}{\Sigma_i n_i} \qquad (29)$$

где y_a – мольная доля вещества исследуемого аналита, n_a – количество вещества исследуемого аналита в смеси, $\Sigma_i n_i$ – сумма количества вещества всех компонентов смеси. Объем аналита V_a отмеряли микропипеткой и вносили через маленькое отверстие в резервуар объемом 5 литров, с газом (азот), расчет количества молекул внесённого аналита рассчитывался по формуле:

$$N = \frac{\rho_a \cdot V_a}{M_a} \cdot N_{\text{Авогадро}} \qquad (30)$$

где ρ_a – плотность аналита, V_a – объем аналита, M_a – молярная масса аналита. Данные внесены в Таблицу 4. Из уравнения состояния идеального газа (уравнения Менделеева-Клайперона) рассчитывалось количество вещества газа носителя:

$$n = \frac{PV}{RT}, \qquad (31)$$

где n – число молей газа; P – давление газа (например, в атм;) V – объем газа (в литрах); T – температура газа (в кельвинах); R – газовая постоянная (8,314 Дж/(моль·K)). Температура в лаборатории 295 К, давление 101325 Па. Для перевода в количество молекул количество вещества умножалось на число Авогадро. Параметры газа-носителя во всех экспериментах с соединениями из таблицы были одинаковыми и расчетное количество вещества газа носителя равно n = 0,20655248 моль.

Таблица 4 Экспериментальные данные аналитов

Аналит	Молярная масса аналита, кг/моль	Объем аналита, $см^3$	Масса аналита, кг	Количество вещества аналита, моль	Мольная доля, моль/моль
Этанол	$4{,}61\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}37\cdot10^{-5}$	$5{,}14\cdot10^{-4}$	$2{,}48\cdot10^{-3}$
Гексан	$8{,}62\cdot10^{-2}$	0,01	$6{,}55\cdot10^{-6}$	$7{,}60\cdot10^{-5}$	$3{,}68\cdot10^{-4}$
Ацетон	$5{,}81\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}37\cdot10^{-5}$	$4{,}08\cdot10^{-4}$	$1{,}97\cdot10^{-3}$
Пиридин	$7{,}91\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}95\cdot10^{-5}$	$3{,}72\cdot10^{-4}$	$1{,}80\cdot10^{-3}$
Триэтиламин	$1{,}01\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}18\cdot10^{-5}$	$2{,}16\cdot10^{-4}$	$1{,}04\cdot10^{-3}$
D-лимонен	$1{,}36\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}52\cdot10^{-5}$	$1{,}85\cdot10^{-4}$	$8{,}96\cdot10^{-4}$
Декан	$1{,}42\cdot10^{-2}$	0,03	$2{,}19\cdot10^{-5}$	$1{,}54\cdot10^{-4}$	$7{,}45\cdot10^{-4}$

Вероятность ионизации органического соединения в эксперименте определяется как отношение суммарного потока ионов соединения к потоку его нейтральных молекул.

2.12 Определение коэффициента пропускания масс-спектрометра

В большинстве опубликованных экспериментов поток ионов при измерениях с масс-спектрометром регистрируется масс-анализатором, пропускание которого неизвестно. Поэтому в большинстве работ, посвященных масс-спектрометрическому определению ЛОС, определяется не вероятность ионизации, а порог обнаружения конкретного соединения, который относится скорее к используемому прибору, чем к физическому процессу образования иона.

В нашем приборе образовавшиеся ионы анализируемых соединений и окружающего газа из области с атмосферным давлением, проходя по транспортной системе масс-анализатора, преодолевают 4 ступени дифференциальной откачки до достижения времяпролётного участка масс-анализатора. В процессе транспортировки часть ионов рекомбинирует в газе и на деталях ионно-оптической части транспортной системы, либо покидает область устойчивой транспортировки и, таким образом, не даёт вклада в регистрируемый ионный сигнал.

Для определения пропускания масс-анализатора было проведено измерение тока положительных ионов на входе транспортной системы (показана схематически на Рисунке 28), и соответствующего тока на ионном детекторе времяпролетного масс-спектрометра. Образовавшиеся внутри камеры (Рисунок 28 а) положительные и отрицательные ионы попадают вместе с током газа в металлическую форвакуумную камеру, откачиваемую до давления 2 Торр и далее через скиммер в камеру, где $5\cdot10^{-3}$ Торр. В режиме регистрации масс-спектра потенциал скиммера ниже потенциала форвакуумной камеры на 30 В, что создаёт предпочтительные условия для транспорта положительных ионов.

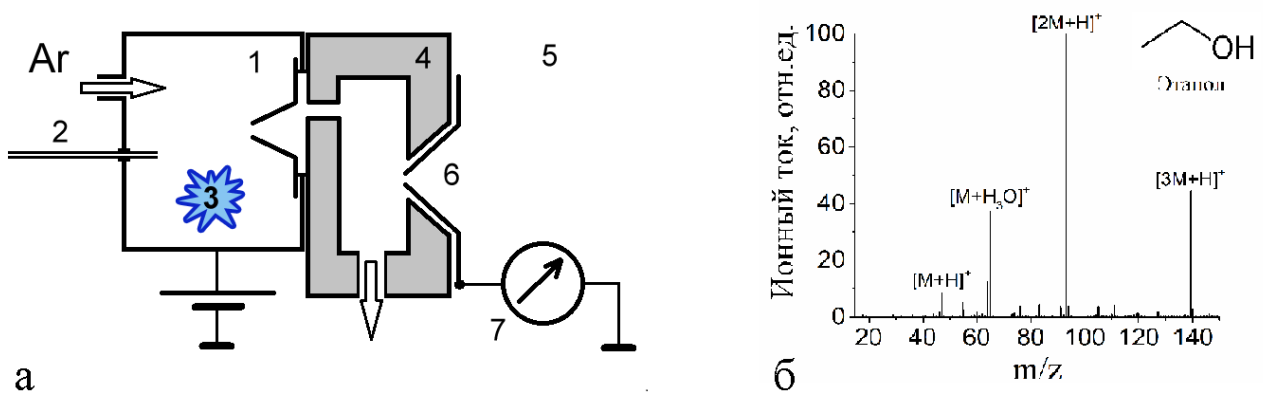

Рисунок 28 - Схема измерения тока ионов, входящих в транспортную систему масс-анализатора (а) и масс-спектр паров этанола (б): 1 –камера ионизации, 2 – капилляр ввода аналита, 3 – лазерная плазма, 4 – промежуточная камера, 5 – камера транспортного квадруполя, 6 – скиммер, 7 – электрометр.

Увеличение разности потенциалов до величины более 60 В приводит к насыщению зависимости регистрируемого тока от разности потенциалов из-за нейтрализации всех поступающих ионов на скиммере (6). Измеренный ток может служить оценкой количества положительных ионов, поступающих во входное отверстие масс-анализатора без учёта потерь ионов на входе камеры. В эксперименте для измерения пропускания прибора в камеру ионизации подавались пары спирта (масс-спектр приведен на Рисунке 28 б). Поток ионов N, нейтрализующихся на скиммере при зарегистрированном в эксперименте токе 25 пА составит:

$$N = \frac{I_P}{e} = 25\cdot10^{-12}/1{,}6\cdot10^{-19} = 1{,}6\cdot10^{8}\ \text{сек}^{-1}. \qquad (32)$$

При тех же условиях в камере ионизации ионный детектор времяпролетного масс-спектрометра регистрирует полный ионный ток амплитудой $8\cdot10^5$ отсчётов АЦП в секунду, что при среднем одноионном импульсе детектора в 5 отсчетов АЦП соответствует потоку $1{,}6\cdot10^5$ ионов в секунду. Эффективность транспортировки, равная отношению входного и выходного потоков ионов составила 10^{-3} [136].

2.13 Предел обнаружения метода

Предел обнаружения (limit of detection или detection limit, сокращенно LoD) — это минимальное содержание определяемого вещества в пробе, сигнал от которого можно надёжно отличить от фона. Предел обнаружения или порог обнаружения - важный параметр метода, который используется как для характеристики аналитического метода, так и для интерпретации результатов анализа. Предел обнаружения принимают равным утроенному значению

стандартного отклонения шумового сигнала. Иными словами сигнал, равный или превышающий уровень сигнала, установленный для предела обнаружения, с вероятностью более 99 % означает, что он относится к искомому компоненту. Существует множество различных подходов, которые можно использовать для оценки LoD. Общий обзор подходов к оценке LoD из наиболее известных руководств можно найти в работах [137–139]. Для расчета был выбран рекомендуемый авторами работ подход. Расчет подразумевает построение калибровочной прямой и поиск ее коэффициентов. На Рисунке 29а приведена калибровочная прямая для триэтиламина и уравнение прямой, а на Рисунке 29б – масс-спектр аналита. Используя коэффициенты уравнения, можно вычислить предел обнаружения, чувствительность и вероятность ионизации метода. Калибровочные прямые были построены для этилового спирта, декана, ацетона, пиридина, Д-лимонена, гексана [135]. Результаты экспериментов по определению вероятностей ионизации, чувствительности [135,136] и пределам обнаружения приведены в Таблице 5 и Таблице 6.

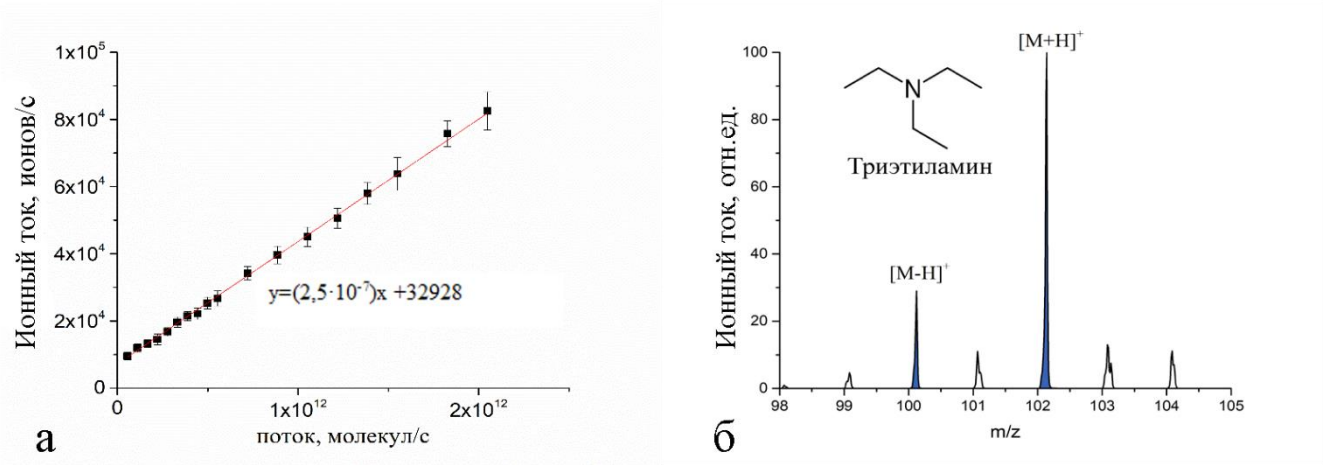

Рисунок 29 - Калибровочная прямая для триэтиламина (а), масс-спектр триэтиламина (б)

Таблица 5 Результаты экспериментов по определению вероятностей ионизации и чувствительностей

	Чувствительность, ион/молекула	Вероятность образования иона	PA, kJ/mol [46]	IE, eV	молярная масса, г/моль
Спирт	$7{,}29\cdot10^{-9}$	$7{,}29\cdot10^{-6}$	776,4		46,068
Декан	$2{,}58\cdot10^{-9}$	$2{,}58\cdot10^{-6}$	690	9,65	142,286
Ацетон	$4{,}91\cdot10^{-8}$	$4{,}91\cdot10^{-5}$	812	9,7	58,08
Пиридин	$2{,}73\cdot10^{-8}$	$2{,}73\cdot10^{-5}$	930	9,26	79,101
Триэтиламин	$1{,}42\cdot10^{-8}$	$1{,}42\cdot10^{-5}$	980	7,53	101,19
D-лимонен	$1{,}75\cdot10^{-8}$	$1{,}75\cdot10^{-5}$	842	8,3	136,24
Гексан	$4{,}61\cdot10^{-9}$	$4{,}61\cdot10^{-6}$	673	10	86,178

Таблица 6 Результаты экспериментов по определению пределов обнаружения

	коэффициент сдвига прямой(b)		коэффициент наклона прямой(k)		LoD, молекул	LoD, пг	LoD, фмоль	Концентрация, ppt
		станд. ошибка		станд. ошибка				
Спирт	7203	211	$3{,}64\cdot10^{-8}$	$4{,}06\cdot10^{-10}$	$8{,}11\cdot10^{10}$	6	135	429
Декан	2665	292	$1{,}29\cdot10^{-8}$	$1{,}68\cdot10^{-9}$	$1{,}83\cdot10^{11}$	43	303	966
Ацетон	32983	2655	$2{,}45\cdot10^{-7}$	$6{,}99\cdot10^{-9}$	$9{,}44\cdot10^{10}$	9	157	500
Пиридин	-1771	1962	$1{,}36\cdot10^{-7}$	$5{,}14\cdot10^{-9}$	$1{,}26\cdot10^{11}$	16	208	665
Триэтиламин	9085	258	$7{,}09\cdot10^{-8}$	$2{,}36\cdot10^{-9}$	$3{,}61\cdot10^{10}$	6	59	191
D-лимонен	-792	1336	$8{,}73\cdot10^{-8}$	$1{,}12\cdot10^{-8}$	$1{,}24\cdot10^{11}$	28	205	655
Гексан	8602	514	$2{,}30\cdot10^{-8}$	$3{,}56\cdot10^{-9}$	$1{,}27\cdot10^{11}$	18	211	674

2.14 Качественное описание механизма формирования ионов

На Рисунке 30 (а и б) показана зависимость чувствительности от энергии сродства к протону и потенциала ионизации. Видно, что разброс по чувствительности для гексана, предельного углеводорода, который имеет крайне малое сродство к протону, и триэтиламина, который имеет высокое сродство протону, практически в районе одного порядка.

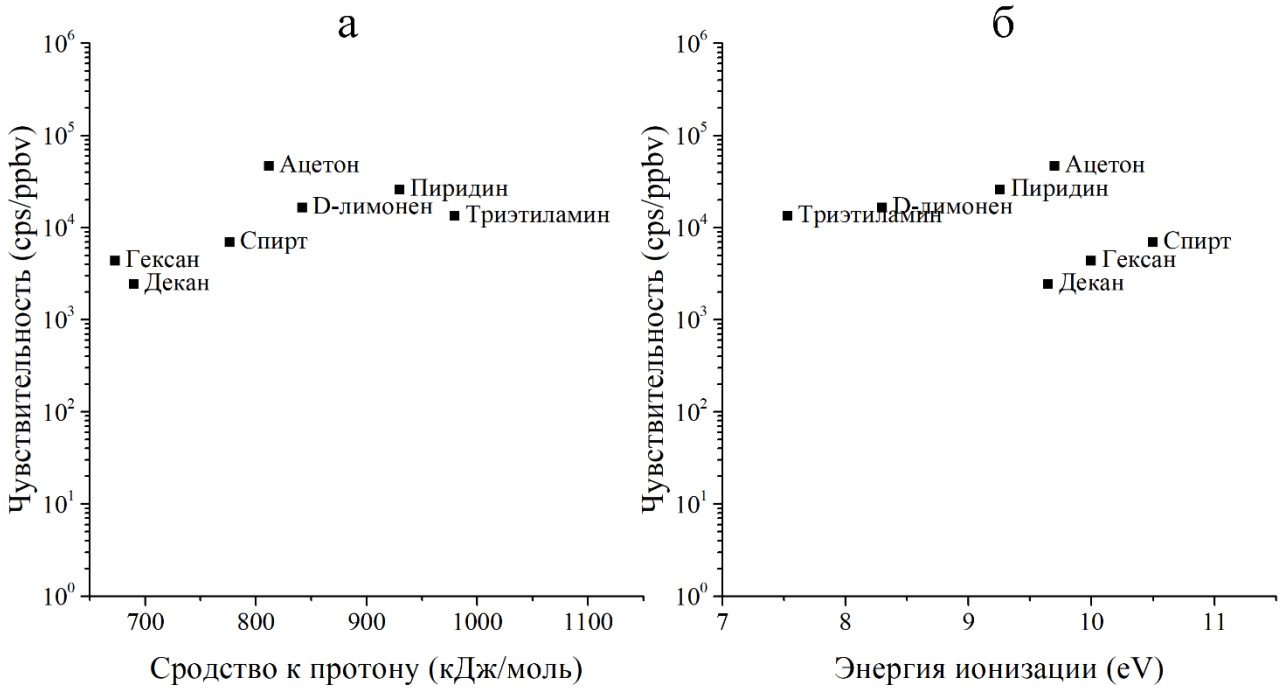

Рисунок 30 - а - зависимость чувствительности от энергии сродства к протону,

б - Зависимость чувствительности от энергии ионизации

В Таблице 7 приведены значения чувствительностей для некоторых представителей ЛОС, принадлежащих различным классам химических соединений, полученных методами в настоящее время применяемыми для анализа ЛОС. Это Proton transfer reaction (Раздел 1.7) и Selected Ion Flow tube (Раздел 1.6). Здесь показаны чувствительности, достигнутые на нашем приборе и чувствительности достигнутые на наиболее близком к нам конкуренте. Мы получаем чувствительности, примерно от 10 до 200 раз более высокие, чем на имеющихся сейчас серийных приборах**.** Таким образом нам удалось получить источник, обеспечивающий ионизацию различных классов химических соединений с близкой эффективностью. Высокая эффективность образования ионов обусловлена одновременным существованием нескольких каналов образования ионов, как это было показано выше [140].

Таблица 7 Сравнение чувствительностей и пределов обнаружения для методов ионизации APLPI и SIFT/PTR

Аналит			APLPI		PTR/SIFT	
	IE, эВ	PA, кДж/моль	Чувствительность, cps/ppbv	LOD, ppt, 1 s	Чувствительность, cps/ppbv	LOD, ppt, 1 s
Этанол	10.48	776	$6{,}89\cdot10^3$	429	33 [141]	
Ацетон	9.7	812	$4{,}64\cdot10^4$	500	855 [141]; 916 [142]; 60 [143]	97[142]; 48[144]
Пиридин	9.26	930	$2{,}58\cdot10^4$	665	80 [141]	-
Триэтиламин	7.53	981	$1{,}34\cdot10^4$	191	-	-
Д Лимонен	8.3	875	$1{,}65\cdot10^4$	655	-	-
Декан	9.6	-	$2{,}44\cdot10^3$	966	-	-
Метанол	10.8	754.3	-	-	252 [141]; 158 [142]; 17 [143]	397 [142];700 [144]
Толуол	8.8	784	-	-	675 [141]; 579 [142]; 79 [143]	47 [142]; 30[144]
а-пинен	8.07	-	-	-	80 [141]; 263 [142]; 27 [143]	67 [142]; 28 [144]
фенол	8.49	817	-	-	130 [141]; 80 [145]	
бензол	9.24	750.4	-	-	549 [141]; 493 [142]; 33 [143]	96 [142];27 [143]

Выводы по главе 2

В данной главе были описаны методики определение характеристик лазерной плазмы, охарактеризовано излучение лазерной плазмы и его свойства. Лазерная плазма, создаваемая путем воздействия импульсным лазерным излучением с плотностью мощности ~70 ГВт/см^2 и энергией импульса 250 мкДж на металлическую мишень, является эффективным инструментом для ионизации органических соединений различных классов при атмосферном давлении. Оценка электронной температурой плазмы и ее изменения во времени, проведенная на основе анализа спектров излучения плазмы, показала, что в первые несколько наносекунд спектр может быть смоделирован излучением черного тела при температуре 5.5×10^4 K. Жесткое УФ излучение такой

плазмы обеспечивает ионизацию любых органических соединений и молекул воды при условии отсутствия поглощения буферного газа.

Каналы образования ионов органических соединений при ионизации излучение лазерной плазмы при атмосферном давлении зависят от спектра пропускания газа для ультрафиолетового излучения. Первичным ионом – источником протона является ион молекулы воды H_2O^+. Эффективность ионизации органических соединений и состав их масс-спектров зависит от состава газовой среды. Оптимальной газовой средой для проведения анализа является аргон (99.99). Эффективность ионизации органических соединений в аргоне до ста раз выше, чем в лабораторном воздухе.

Найдено, что в зависимости от химических свойств органических соединений, в масс-спектрах регистрируются различные виды ионов аналитов. Основными каналами ионизации исследованных соединений являются следующие: реакция передачи протона с образованием протонированных молекул: реакция с присоединением аддуктов с образованием ионов вида $[M+NH_4]^+$ и $[M+H_3O]^+$; фотоионизация с образованием молекулярных ионов. Ионы неполярных соединений, такие как углеводороды, образуются путем предварительного окисления и последующей ионизации окисленных молекул. Показано, что аммиак, регистрируемый в ряде случаев в качестве аддукта, синтезируется в непосредственно камере ионизации.

Помимо этого, в данной главе была определена чувствительность метода, измерены пороги обнаружения. На основе этого параметра удалось получить абсолютные значения вероятностей образования ионов.

В работе впервые был проведен сравнительный анализ чувствительностей и порогов обнаружения для представителей различных классов химических соединений, полученных методом APLPI MS и основными конкурентами метода – SIFT MS и PTR MS. Полученные чувствительности от 10 до 200 раз более высокие, чем на имеющихся сейчас серийных приборах. Такой результат обусловлен наличием одновременным существованием нескольких каналов образования ионов. Полученные пределы обнаружения в среднем уступают в 10 раз. Это, по-видимому, связано с нестабильностью факела плазмы и требует дополнительных технических решений.

Глава 3 Применение метода для анализа ЛОС пищевых продуктов, животных и человека

В этой главе предложен подход к проведению масс-спектрометрического анализа ЛОС реальных биологических образцов без пробоподготовки в режиме реального времени при атмосферном давлении. Основой метода является ионизация ЛОС жестким УФ излучением лазерной плазмы. Подход к обработке полученных данных зависит от поставленной задачи. В зависимости от постановки задачи можно выделить три основных подхода, не единственных, но наиболее популярных на настоящий момент. В первом случае – это полная интерпретация спектра и выделение целевого соединения или маркера в пробе, например, методом ГХ-МС. Использование хроматографии означает пробоподготовку, которая, вместе с собственно хроматографией, требует много времени. Для осуществления такого подхода нужно точно знать, как выглядит спектр целевого соединения. Например, это может быть наркотическое вещество, допинг, маркерное соединение или биомаркер. Биомаркер может быть определен как «характеристика, которая объективно измеряется и оценивается как индикатор нормальных биологических процессов, патогенных процессов или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство» [146].В случаях, когда задача состоит в поиске отличий одного типа от другого применяется подход, подразумевающий полную интерпретацию всего масс-спектра и применение хемометрики. Основа принятия решения – это сравнение с эталоном. Недостаток такого подхода заключается в том, что для его осуществления также необходимо высокое разрешение и часто большой набор статистических данных. Математически этот подход может быть оценен с помощью стандартных методов поиска отличий, например: t-критерий или дисперсионный анализ. Третий подход используется, когда спектр не интерпретируем, очень часто это работа с сырыми данными, но используется источник, обеспечивающий эффективную ионизацию различных соединений. Такой подход позволяет работать с образцами «как они есть», чувствительность для него достаточна. К достоинствам можно отнести производительность, отсутствие пробоподготовки и связанной с пробоподготовкой внесенной информации, отсутствие хроматографии. Как и во втором подходе основа принятия решения — это сравнение с эталоном, в зависимости от задачи это: чистый продукт, здоровый человек, целевой образец.

В зависимости от полученных масс-спектрометрических данных обработка может включать такие стадии как: калибровка, нормирование, фильтрация от шумового сигнала, выбор определенного диапазона масс, сравнение масс-спектрометрического пика или пиков конкретных соединений различными методами хемометрики, машинного обучения и нейронных сетей.

2.1 Методы выделения информации из масс-спектрометрических данных

Масс-спектр представляет собой график или таблицу интенсивности (количества) ионов в образце от определенного значения m/z. Эти значения интенсивности вместе со значениями m/z представляют собой «отпечаток пальца» образца, в литературе часто употребляют английский термин фингерпринт (fingerprint), в статье [96] А.В. Лисицы используется термин «штрих-код». Следовательно, глядя на дифференциальную картину спектров образцов, можно обнаружить наличие или отсутствие такого заболевания, как рак. Стандартным подходом для классификации и кластеризации масс-спектрометрических данных становится использование методов математической статистики, хемометрики, машинного обучения и нейронных сетей [147–149].

Наибольшую трудность при анализе массивов масс-спектров представляет размерность данных, что делает необходимым поиск сокращенного набора признаков, который покажет оптимальные дискриминационные критерии между контрольной и целевой группами. С другой стороны, размеры выборки, то есть количество масс-спектров, полученных от различных образцов намного меньше, чем количество признаков и пиков в масс-спектре. Следовательно, уменьшение размерности и/или выбор признаков являются одними из основных шагов, необходимых для осмысленного анализа данных.

В результате масс-спектрометрического анализа биологических объектов получаются объемные и многообразные наборы данных. Для получения полезной информации из большого количества наборов масс-спектров не обязательно расшифровывать каждый отдельный спектр и его составляющие пики. Необходима визуализация данных, то есть представление наглядной форме результатов эксперимента, так как масс-спектры реальных объектов сложно сравнить и сопоставить в своем первоначальном виде. Одним из широко используемых методов уменьшения размерности в контексте данных масс-спектрометрии является метод главных компонент (МГК) или Principal Component Analysis (PCA) [150–152]– алгоритм понижения размерности данных без существенной потери информативности. Метод главных компонент позволяет отобразить многомерные данные на двух-трехмерной поверхности, делая информацию более доступной для восприятия. Метод заключается в переходе к новому ортогональному базису, оси которого ориентированы по направлениям максимальной дисперсии набора входных данных. Вдоль первой оси нового базиса дисперсия максимальна, вторая ось максимизирует дисперсию при условии ортогональности первой оси, и так далее, последняя ось имеет минимальную дисперсию из всех возможных. Можно отметить, что в основе метода главных компонент лежат следующие допущения: 1) допущение о том, что размерность данных может быть эффективно понижена путем линейного преобразования и 2) допущение о том, что больше всего информации несут те направления, в которых дисперсия входных данных максимальна.

Следующим шагом является поиск подходящего алгоритма классификации, который может использовать эти биомаркеры/характеристики/переменные и соотнести тестовый образец к группе болезни или группе, не связанной с заболеванием.

2.2 Экспериментальная установка для анализа ЛОС реальных объектов

Для того чтобы анализировать реальные биологические объекты было разработано устройство ввода пробы в камеру ионизации. Устройство, изображенное на Рисунке 31 позволяет подсоединять микробирку типа эппендорф, причем проба может быть как жидкая, так и порошкообразная, на пневморазъем и продувать ее потоком газа (аргон, 99,995). Летучие органические соединения образца транспортируются потоком газа-носителя в ионизационную камеру к области ионизации. Поток газа-носителя был разделен таким образом, что 90% потока поступало непосредственно в камеру, а 10% проходило через пробирку с образцом. Чтобы исключить попадание в камеру окружающего атмосферного воздуха при смене пробирок с образцами в камере поддерживалось избыточное давление 30 торр. Расход газа ~7 см^3/с примерно соответствовал скорости отбора газообразной пробы масс-анализатором.

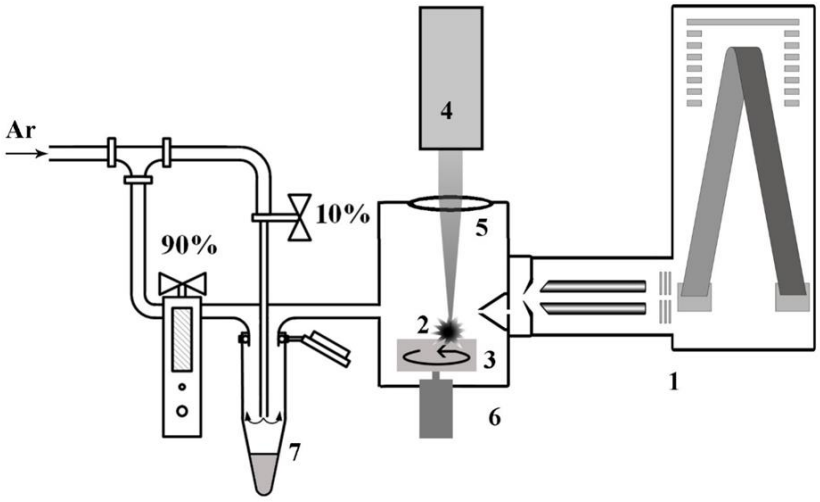

Рисунок 31 - Схема лазерного масс-спектрометра: 1 – времяпролетный масс-анализатор, 2 – лазерная плазма, 3 – вращающаяся металлическая мишень, 4 – Nd:YAG лазер, 5 – фокусирующая линза, 6 – камера ионизации, 7 – микроцентрифужная пробирка.

Замена микропробирок с пробами происходит поочередно с пустой микропробиркой, это делается для того, чтобы убедиться в полной очистке камеры от ЛОС после анализа предыдущей пробы. В среднем на полную очистку (продувку) камеры необходимо менее минуты. Более никаких манипуляций для очистки камеры не требуется.

Объем пробы оценивается предварительными экспериментами. В наших экспериментах объем пробы для анализа ЛОС реальных объектов составлял от 20 до 40 мкл.

2.3 Анализ продуктов питания

Среди большого разнообразия пищевых компонентов летучие органические соединения имеют большое значение из-за их вклада в развитие запаха в пищевых продуктах, который является основным атрибутом для рассмотрения приемлемости пищевых продуктов. Научные данные [153] свидетельствуют о том, что запах является наиболее чувствительной характеристикой, определяющей срок годности пищевых продуктов, по сравнению с другими сенсорными характеристиками, такими как внешний вид и текстура. Определение ЛОС, играющих важную роль в аромате пищевых продуктов, всегда было сложной задачей, поскольку профиль запаха пищевых продуктов содержит много летучих органических соединений в широком диапазоне концентраций, и в то же время характерный запах конкретного пищевого продукта может часто из состоять нескольких соединений в следовых количествах. Еще одна сложная проблема связана с тем, что на профиль ЛОС влияет географическое происхождение, сезонные колебания, разные условия хранения, поэтому даже разные партии одного и того же продукта питания могут иметь дифференцированный профиль летучих веществ [154].

Масс-спектрометрия широко используется в области безопасности пищевых продуктов и полностью внедрена как в рутинных аналитических лабораториях, так и в исследовательских лабораториях и является важным инструментом для мониторинга загрязнения и контроля пищевых продуктов [155–158]. Примеры различного применение: поиск фальсификата, страны происхождения, неправильная маркировка, связанная с географическим, ботаническим или видовым происхождением. Небезопасная пища, содержащая вредные бактерии, вирусы, паразиты или химические вещества, вызывает более 200 заболеваний, от диареи до рака. По данным 2019 года Всемирной организации здравоохранения приблизительно 10% людей в мире заболевают после употребления в пищу загрязненных пищевых продуктов, и поэтому безопасность пищевых продуктов является приоритетом общественного здравоохранения. Общие источники загрязнения пищевых продуктов включают пестициды, токсины, аллергены, стимуляторы роста, загрязнители окружающей среды, ветеринарные препараты и загрязнители, возникающие во время хранения и обработки пищевых продуктов.

Применение метода APLPI для анализа ЛОС для мониторинга качества продуктов питания имеет очевидную ценность. Чтобы продемонстрировать преимущества метода в некоторых из этих областей, были проведены следующие пилотные исследования, посвященные анализу продуктов питания.

2.4 Анализ летучих соединений, выделяемых йогуртами при комнатной температуре образца

Для демонстрации возможности применения метода для анализа пищевых продуктов был проведен эксперимент с йогуртами. В эксперименте использовались йогурты: «активия» без добавок - 10 проб, «активия малина со злаками» - 6 проб, «активия манго» - 4 пробы, «активия чернослив» – 15 проб, «чудо-йогурт малина-черника» - 7 проб. Особенность эксперимента заключалась в том, что анализ проводился без использования буферного газа: образец йогурта подносился к заборнику масс-спектрометра, и записывался масс-спектр воздуха перед заборником. Из Рисунка 32 видно, что масс-спектр йогуртов сильно различается профилем и можно выделить пики ароматизаторов.

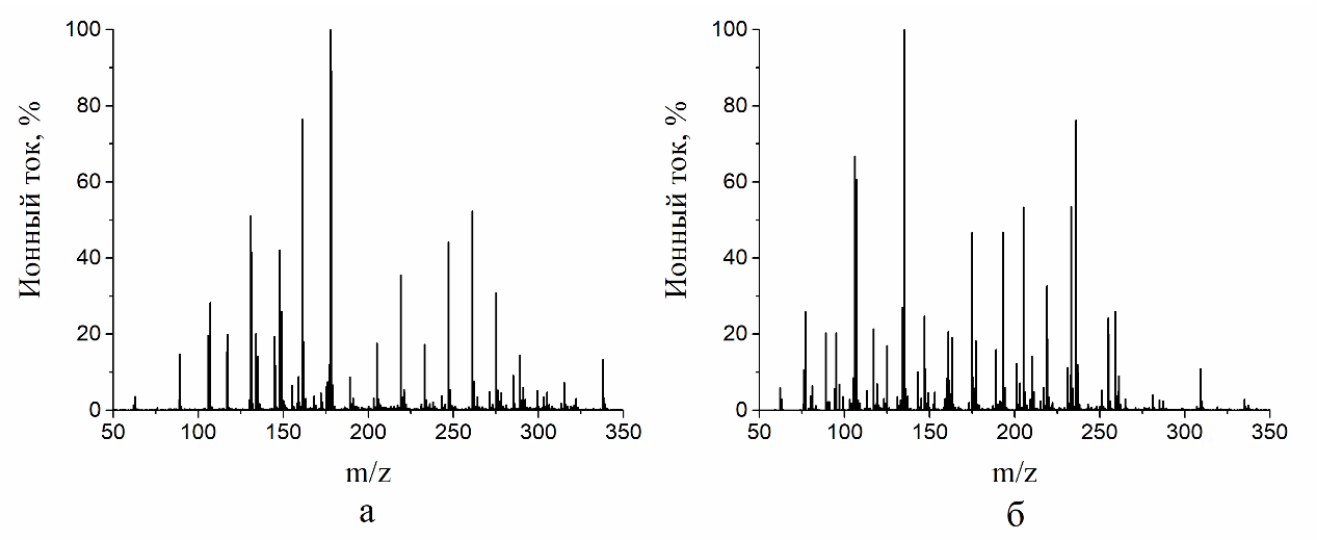

Рисунок 32 – Масс-спектры йогуртов: а – усредненный масс-спектры йогурта активиа «малина со злаками», б – усредненный масс-спектр йогурта чудо «малина черника»

Для анализа в масс-спектрах были выделены пики амплитудой более 20 каунтов, получилось 76 пиков в диапазоне масс до 300 Да. К полученным пикам был применен метод главных компонент, полученный результат приведен на Рисунке 33

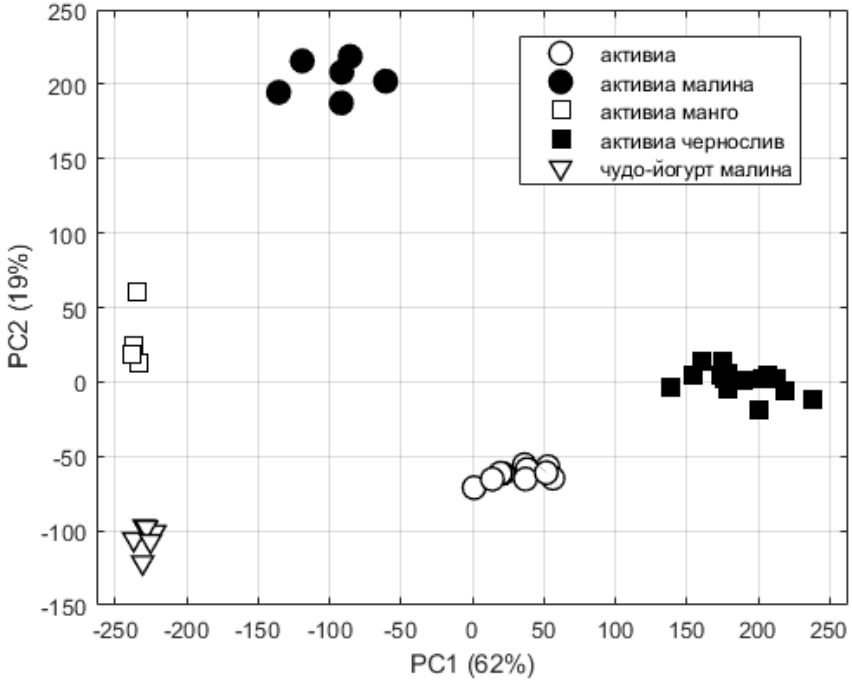

Рисунок 33 - Применение метода главных компонент к масс-спектрам йогуртов.

На рисунке каждому масс-спектру соответствует одна точка в пространстве первых двух главных компонент. Видно, что точки группируются в области, соответствующие типу йогурта. Эксперимент показал возможность применения метода для получения воспроизводимых масс-спектров реальных пищевых продуктов и применимости для дифференциации типа йогурта.

2.5 Анализ кофе

Для еще одной иллюстрации возможности анализа продуктов питания, был проанализирован более сложный продукт, содержащий огромный набор природных ЛОС – это кофе. Эта работа проводилась совместно с профессиональным обжарщиком кофе и в эксперименте использовался кофе класса specialty. Спешелти кофе - называется зеленый кофе, заслуживший от 80 баллов и выше по шкале оценки Q grade system. Для эксперимента использовались два лота кофе: Сальвадор Пуэрто Артуро COE NW и Сальвадор Дон Жаиме COE NW. Оба кофе выращены в Сальвадоре, первый кофе в городе Субурбиос региона Аучапан и второй в городе Санта Роза региона Чалатенанго соответственно и принадлежат разновидности «панамара» сорта арабики. Для каждого было приготовлены образцы трех степеней обжарки. Кофе обжаривалось, перемалывалось и анализировалось масс-спектрометром в течении одного дня. Образцы, в виде порошка, кончиком шпателя, не касаясь стенок, насыпались на дно 1,5-миллилитровой пробирки типа эппендорф. Были получены масс-спектры 3 проб каждого типа обжарки каждого лота кофе. Пример масс-спектра кофе приведен на Рисунке 34.

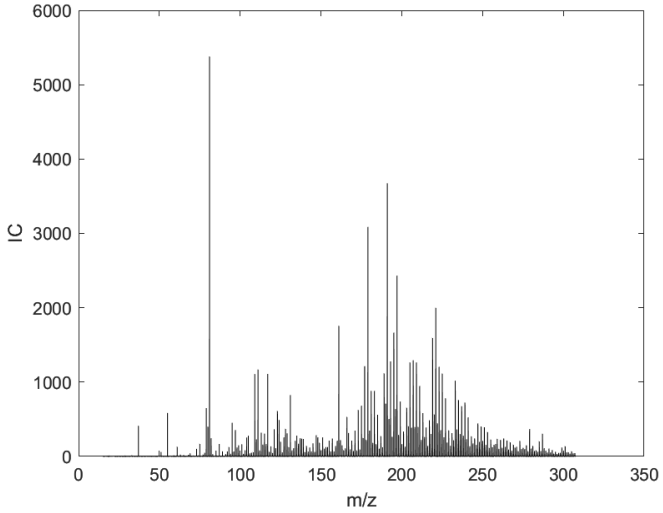

Рисунок 34 Масс-спектр кофе, регистрируемый при комнатной температуре образца в потоке аргона.

При обработке масс-спектрометрических данных было выделено 359 пиков выше 20 каунтов в диапазоне от 18 до 400 m/z. Для визуализации различий к масс-спектрам был применен метод главных компонент, результат представлен на Рисунке 35. Название типов проб для Сальвадор Пуэрто Артуро COE NW: 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильная степени обжарки. Номера 4, 5, 6 соответствуют пробам кофе Сальвадор Дон Жаиме COE NW с аналогичными степенями обжарки.

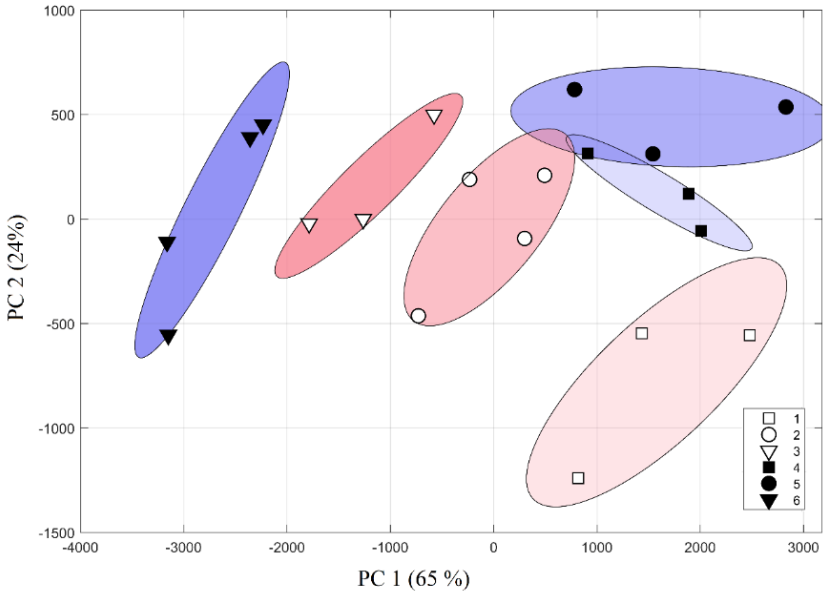

Рисунок 35 - Применение метода главных компонент к масс-спектрам кофе. Синим выделен сорт Сальвадор Пуэрто Артуро COE NW, красным - Сальвадор Дон Жаиме COE NW, степень окраски и маркеры соответствуют степени обжарки.

Из Рисунка 35 видно, что после понижения размерности методом PCA и визуализации в первых двух главных компонентах, точки, соответствующие масс-спектрам проб кофе одного типа, группируются в зависимости от лота кофе и степени обжарки для каждого сорта.

Иной подход для идентификации образцов по масс-спектрам кофе предполагает выделение пиков конкретных соединений - маркеров, соответствующих определенным соединениям. Было выделено три соединения – пиридин, тригонеллин, ваниллин, присутствие которых подтверждается литературными данными. На Рисунке 36 показаны значения интенсивностей пиков для каждого образца: а – ваниллина (mz 153,057 M+H табличное значение $C_8H_8O_3$+H = 153,0551664, масс-спектр ваниллина полученный методом APLPI описан в работе [159]), б – тригонеллина ((m/z 138,056 $C_7H_7NO_2$+H 138,0555008) и в – протонированного димера пиридина (m/z 159,095 2(C_5H_5N)+H 159,0922186). Видно что по значению ванилина можно различать лот кофе, а по значению тригонеллина и пиридина – степень обжарки [160,161]. Наличие именно тригонеллина в кофе обуславливает его запах при обжарке потому, как при термической обработке тригонеллин превращается в пиридин. На Рисунок 36 видно, что с увеличением степени обжарки значение интенсивности для тригонеллина падает, а для пиридина растет.

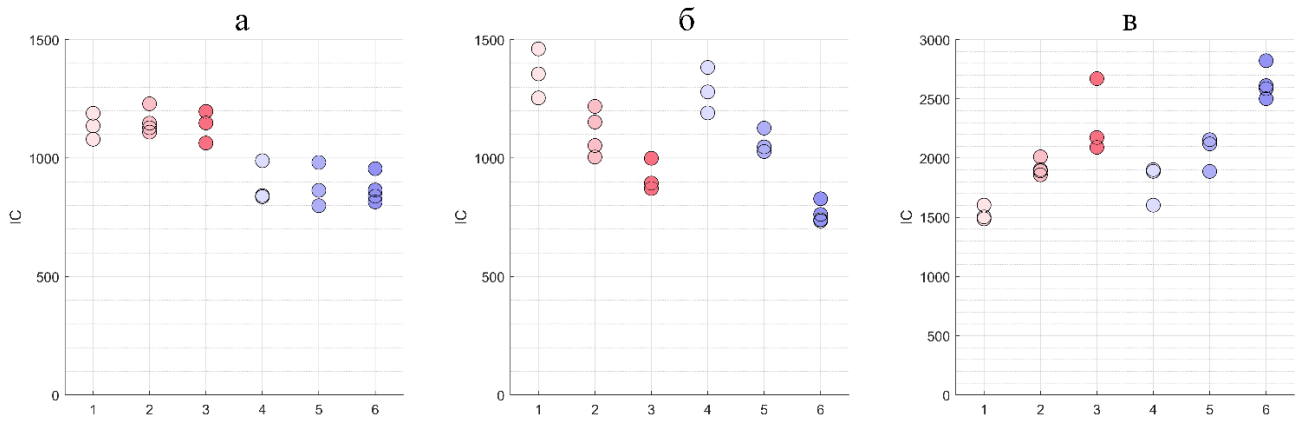

Рисунок 36 – Значение интенсивностей некоторых пиков масс-спектров кофе: а - ваниллин (mz 153,057), б - тригонеллин (m/z 138,056) и в - димер пиридина(m/z 159,095). Синим выделен сорт Сальвадор Пуэрто Артуро COE NW, красным - Сальвадор Дон Жаиме COE NW, степень окраски и маркеры соответствуют степени обжарки.

Этот эксперимент показывает возможность получать масс-спектры продуктов имеющий сложный состав ЛОС с хорошей воспроизводимостью и возможность идентифицировать пробу по масс-спектру.

2.6 Масс-спектрометрический анализ биологических образцов.

Целью экспериментов с биологическими жидкостями было нахождение режимов, при которых возможен масс-спектрометрический анализ ЛОС, выделяемых биологическими жидкостями без пробоподготовки при комнатной температуре образца. В экспериментах использовались четыре группы образцов биологических жидкостей: моча мышей, моча, слюна и желчь человека. Все образцы анализировались без пробоподготовки, в состоянии «как они есть»

На Рисунке 37 приведены примеры спектры урины двух человек. На Рисунке 37а пример мочи здорового человека. На Рисунке 37б масс-спектр человеческой урины с высокой концентрацией ацетона. Интерпретация основных пиков приведена на рисунке. Образование протонированных димеров и аддуктов с аммонием говорит о высокой концентрации ацетона в моче. Это явление известно как ацетонурия или кетонурия, и иногда она является признаком болезни.

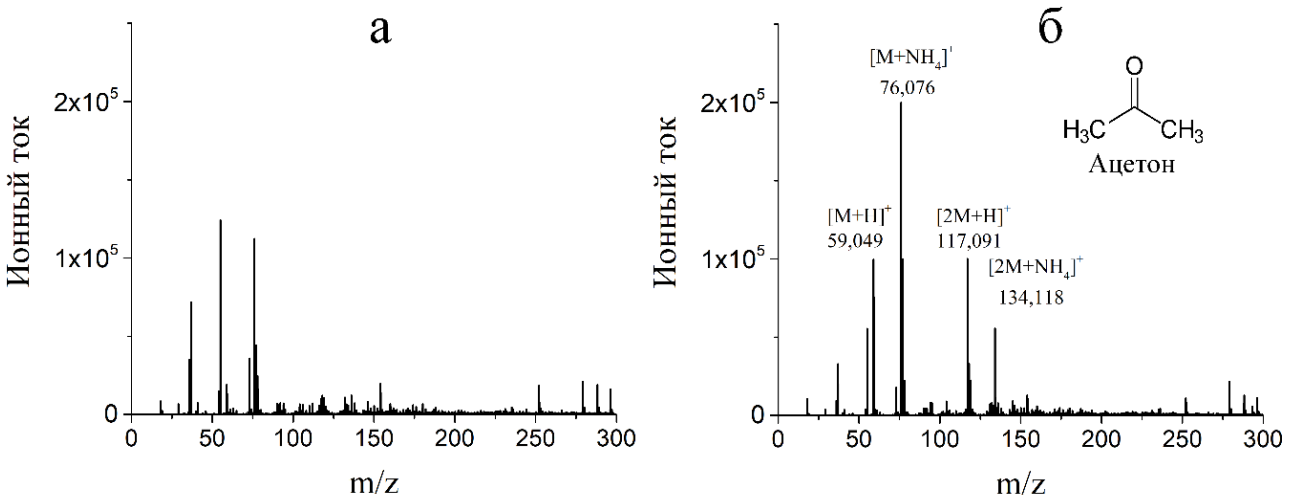

Рисунок 37 – Масс-спектры человеческой урины: а – масс-спектр человеческой урины, б – масс-спектр человеческой урины с высокой концентрацией ацетона.

На Рисунок 38 приведены масс-спектры ЛОС образцов желчи, полученные из невоспаленного и воспаленного желчного пузыря в ходе хирургического вмешательства. Также, как и в предыдущих экспериментах наблюдаются значительные отличия в масс-спектрах как в составе соединений, так и в амплитуде полного ионного тока.

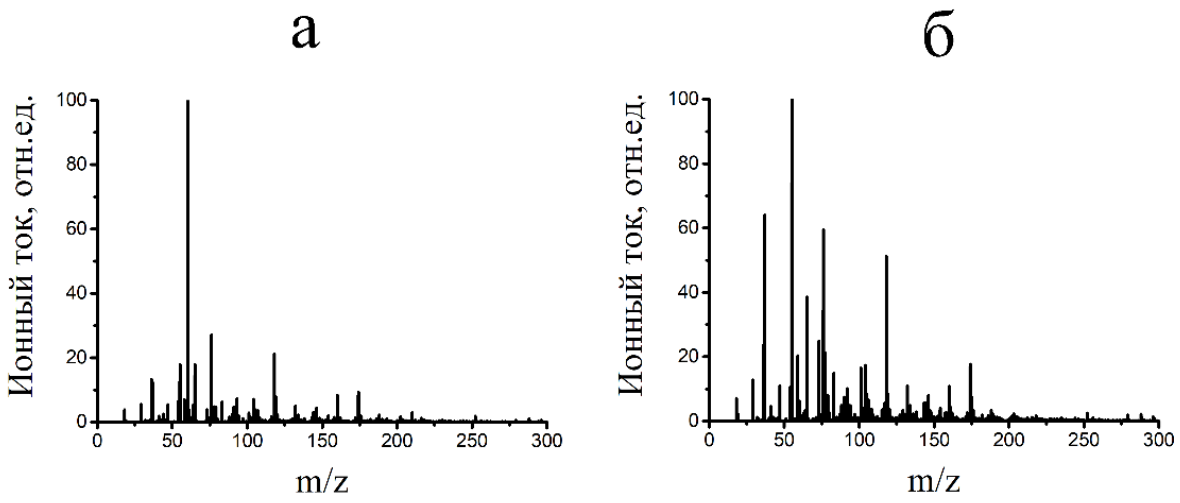

Рисунок 38 – Масс-спектры желчи: а – масс-спектр желчи полученной из здорового желчного пузыря, б – масс-спектр желчи полученной из воспаленного желчного пузыря

На Рисунке 39 приведены примеры масс-спектров проб слюны, полученных из околоушной слюнной железы 3 пациентов. Сбор из слюнных желез позволяет получить чистую пробу, исключив влияние недиагностических факторов – следов пищи, курения, гигиенических процедур. Исследование проводилось также без пробоподготовки при комнатной температуре образца. Как видно из Рисунка 39, наблюдаются сильные отличия как в амплитуде отдельных пиков, так и в составе масс-спектра. Результат показывает, что ЛОС слюны имеют высокую характеристичность и потенциально могут быть использованы в диагностических целях.

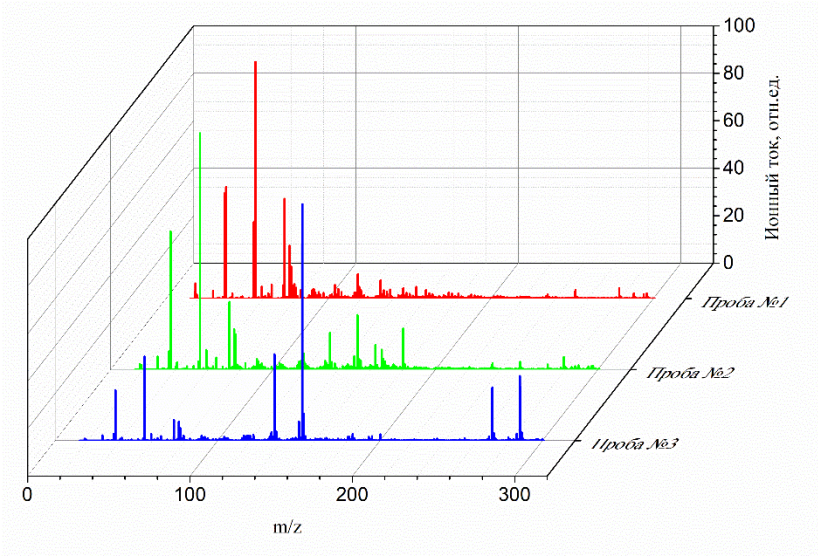

Рисунок 39 – Масс-спектры образцов слюны человека, полученные от 3 пациентов из околоушной слюнной железы.

Чаще всего признаком болезни может служить изменение соотношений внутри набора соединений в пробе биологической жидкости, количество которых может достигать нескольких сотен. В этом случае выделение конкретного маркерного соединения в пробе невозможно и для решения о принадлежности данного образца к группам с конкретными патологическими изменениями или их отсутствием могут использоваться классические статистические подходы и хемометрических методы обработки данных [162].

Проведенные эксперименты показали, что во всех трех случаях возможен прямой анализ ЛОС, получаемых из пробы биологической жидкости без пробоподготовки в нормальных условиях [136]. Обнаруженные различия подтверждают предположение о возможном применении разработанного метода для определения патологических изменений организма.

2.7 Применение метода для определения животных, инфицированных гепатокарциномой.

В целях уменьшения параметров, вносящих дополнительную информацию связанную с изменениями ЛОС, такими как образ жизни, рацион, возраст и прочее в качестве модельного эксперимента было проведено исследование на лабораторных мышах. Эксперименты проводились совместно с биологами из института Проблем Передачи Информации Российской Академии Наук имени А.А. Харкевича. Одно из направлений их исследований связано с процессом распознавания запахов собаками. В экспериментах собаки показывают способность к поиску заболевания у мышей, зараженных раком. Вероятность обнаружения пробы мочи животного, инфицированного раком, составляет более 80%. Целью нашего эксперимента было показать возможность обнаружения проб, полученных от мышей, зараженных раком с помощью метода APLPI.

Экспериментальной моделью онкологического заболевания служили самцы гибридных мышей BDF-f1. 4-месячным гибридным самцам подкожно в лопаточную область трансплантировали 100 мг измельченной опухолевой ткани в 0.5 мл 0.9 процентного физиологического раствора. Использовался штамм Н33 перевиваемой гепатокарциномы мышей, полученный в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина МЗ РФ. Контролем служили интактные самцы мышей той же линии, и самцы с трансплантированной тканью здоровой печени (100 мг измельченной ткани здоровой печени в 0.5 мл 0.9 процентного физиологического раствора). Здоровую ткань печени перевивали точно так же, как опухолевую ткань. Все животные содержались в одинаковых условиях - по десять особей в стандартных пластиковых клетках.

У мышей собирали мочу с 1 по 14 сутки после перевивки ткани (от инъекции до развития опухоли, видимой невооруженным глазом через шкуру животного у всех мышей). За мышами в

клетках постоянно наблюдали и собирали мочу сразу после ее выделения, стараясь чтобы ни части тела субъекта, ни фекалии не попали в пробирку с образцом. Даже при таком сборе мочи не всегда удавалось собрать образцы у всех мышей, не совсем удалось собрать мочу на 6,9,11,12 и 13 дни после перевивки ткани. С помощью автоматического дозатора мочу делили на порции по 60 мкл и переносили для хранения в микроцентрифужные пробирки типа эппендорф, которые сразу замораживали при -23 ^{0}С и размораживали непосредственно перед проведением эксперимента. Перед измерениями образцы размораживали при комнатной температуре в течение 60 минут и без дополнительной подготовки микропипеткой разливались по микроцентрифужным пробиркам порциями по 20 мкл. Исследования проводились слепым методом со случайным выбором пробы. Оператор масс-спектрометра не знал про исследуемую пробу ничего, кроме условного номера. Всего было проанализировано 149 пробы мочи мышей, полученных в течении 14 дней после перевивки здоровой ткани печени и гепатокарциномы (за исключение 6,9,11,12 и 13 дней, в которые не удалось собрать мочу мышей). Так как не всегда удавалось собрать мочу у всех 30 животных, количество полученных проб мочи в некоторые дни оказалось недостаточным, поэтому исходя из полученных нами данных о развитии перевитой опухолевой ткани, для анализа методом главных компонент спектры собранных проб мочи объединили в три группы: первая группа содержит масс-спектры проб 1-3 суток, вторая группа – 4-5 суток, третья группа – 7-8 суток, четвертая 10-14 сутки. В Таблице 8 приведены данные по количеству сбора проб.

Таблица 8 Данные по количеству проб в каждый день после перевивки ткани

Дни с момента перевивки	Суммарное количество проб	Количество проб мочи мышей с перевитой опухолевой тканью, шт.	Количество проб мочи мышей с перевитой здоровой тканью печени, шт.	Количество проб мочи мышей из интактной группы, шт.
1-3	47	16	15	16
4-5	35	12	10	13
7-8	41	14	15	12
10-14	26	14	7	5

Измерения проводились на установке, описанной выше (Рисунок 31). На Рисунке 40 показано график полного ионного тока после присоединения пробирки с пробой мочи. На графике видно, что сначала происходит «выброс» полного ионного тока (участок 1-2), связанный с замещением в пробирке воздуха на аргон, далее следует участок 2-3 с постоянной амплитудой, который использовался для обработки данных.

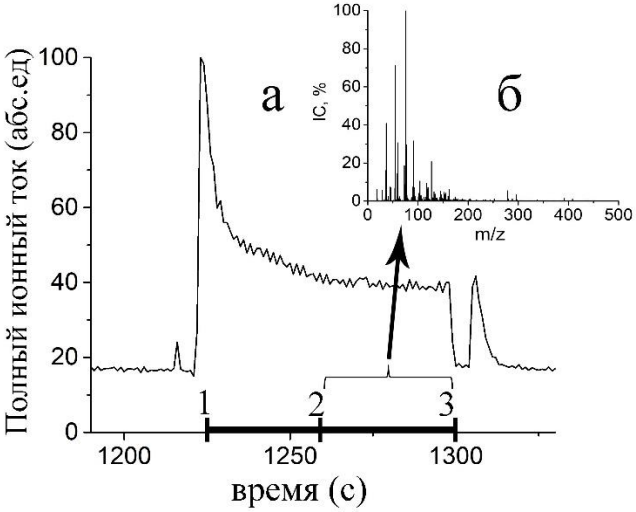

Рисунок 40 а – изменение ионного тока, б – масс-спектр ЛОС мочи мыши

Группы спектров импортировались в JupiterNotebook программы Python и обрабатывались с помощью библиотеки Scikit-learn [163]. С масс-спектрами не проводилась какая-либо предобработка данных. К исходным масс-спектрам был применен метод главных компонент. Построенные в первых двух компонентах данные, создают характеристические области для каждой группы животных. Каждому масс-спектру конкретного образца соответствует одна точка в пространстве главных компонент. Разделение на области в координатах первых двух главных компонент, соответствующие трем группам животных, проводилось методом логистической регрессии. Результаты приведены на Рисунке 41.

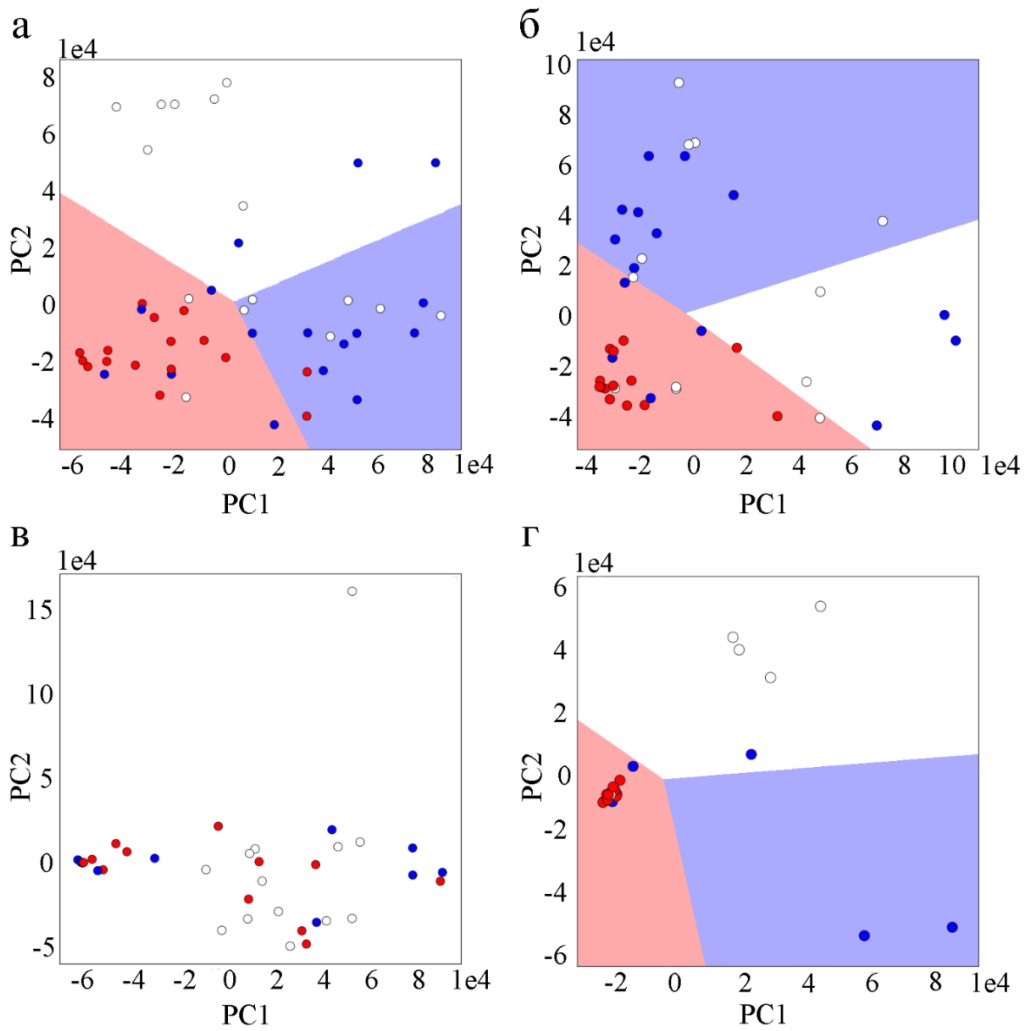

Рисунок 41 – Результаты применения метода главных компонент для 3х групп по дням после перевивки ткани: а – 1-3 день, б – 4-5 день, в – 7-8 день, г – 10-14 день. Белые круги – пробы мочи интактных мышей, синие – пробы мочи мышей с перевитой тканью здоровой печени, красные – пробы мочи мышей с перевитой тканью гепатокарциномы.

Можно видеть, что пробы мочи мышей с перевитой гепатокарциномой устойчиво выделяются на 1-3,7-8 и 10-14 день после перевивки тканей. На 4-5 день нет выделения какого-либо типа проб. Для дней с успешным разделением можно привести точность определения для каждой группы мышей, которая равна отношению, правильно определённых объектов ко всем объектам определяемого класса [164]. Результаты отображены в Таблице 9. Точность (precision or positive predictive value) рассчитывалась по формуле:

$$\text{Точность} = \frac{TP}{TP+FP}, \qquad (33)$$

где TP – истинно положительные (true positive), TF – истинно отрицательные (false positive).

Таблица 9 Точность определения проб по группам

Дни с момента перевивки	Точность определения проб мочи мышей с перевитой опухолевой тканью, шт.	Точность определения проб мочи мышей с перевитой здоровой тканью печени, шт.	Точность определения проб мочи мышей из интактной группы, шт.
1-3	0.82	0.71	0.82
4-5	-	-	-
7-8	0.77	0.67	0.72
10-14	0.81	0.81	0.92

Эта ситуация коррелирует с экспериментами наших коллег с собаками и предположительно связана с изменением массы перевитой ткани гепатокарциномы. На Рисунке 42 представлены результаты экспериментов по детектированию собаками образцов мочи мышей с перевитой гепатокарциномой в сравнении с образцами мочи мышей, которым перевита здоровая ткань печени [165].

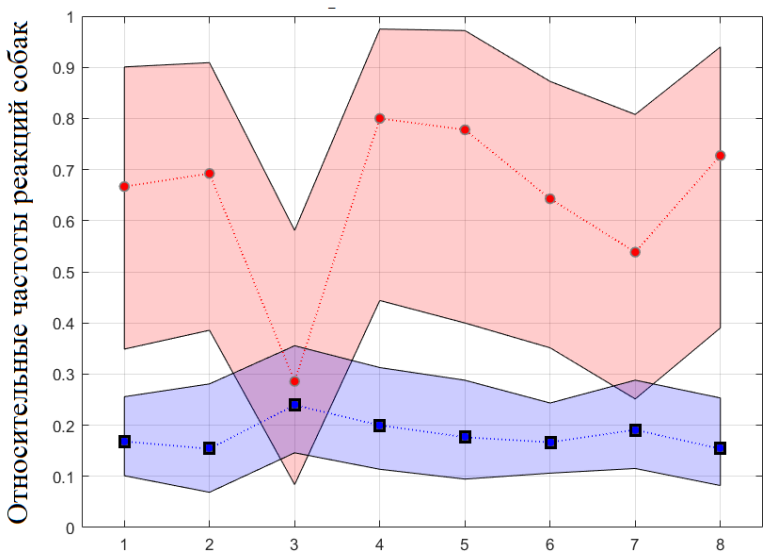

Рисунок 42 – Относительные частоты истинно положительных и ложноположительных реакций собак на образцы мочи, собранные на соответствующий день. Красными и синими точками показаны истинно положительных и ложноположительных реакций собак на образцы мочи соответственно. Закрашенные области соответствуют 95% доверительному интервалу.

На первый и второй день развития перевитой ткани гепатокарциномы собаки успешно отличают мышей с перевитой опухолевой тканью от мышей с перевитой здоровой тканью печени по запаху мочи, однако на третьи сутки развития опухоли собаки не отличают мышей с перевитой

опухолевой тканью от особей с перевитой здоровой тканью печени. С четвертого дня развития опухолевой ткани обнаружение больных мышей не вызывает у собак трудностей, и, хотя успешность обнаружения не всегда одинакова, в среднем она всегда выше 50%.

На Рисунке 43 показано как изменяется масса чужеродной ткани по дням после перевивания [165]. Видно, что относительная масса опухолевой ткани уменьшается к 3 дню, а на 4 день начинается ее рост, и к 6-му дню относительная масса опухолевой ткани в несколько раз превышает количество ткани, перевитой мыши изначально.

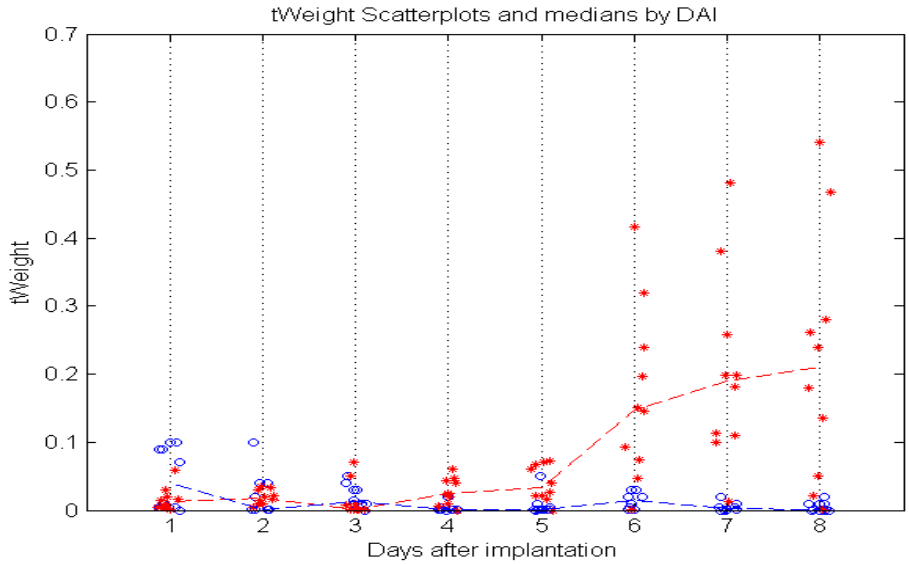

Рисунок 43 - Изменения массы чужеродной ткани по дням после перевивания. По горизонтальной оси показаны дни после введения, а по вертикальной – значения массы измененной ткани («опухоли») в граммах. Значения массы опухоли после введения H33 показаны красными маркерами, а те же данные для мышей, которым была введена здоровая печень – синими [165]

Наблюдаются некоторые различия в результатах, полученных в экспериментах с собаками и с помощью масс-спектрометрии [166,167]. В то время, как собаки перестают различать пробы мочи мышей с перевитой опухолевой тканью и тканью здоровой печени, на 3 сутки после перевивки, отсутствие различий в масс-спектрах мы наблюдаем на 4-5 сутки. Предполагается, это объясняется использованием разных групп мышей в этих экспериментах. Дело в том, что, как можно видеть из рисунка, динамика развития опухолевой ткани не одинакова у различных особей, и, вероятно, зависит не только от индивида, но и от того, как развивалась опухолевая ткань до перевивки.

2.8 О возможности применения метода для определения врожденных уропатий у детей.

Для демонстрации возможности применения метода APLPI в клинических целях совместно с врачами-нефрологами из Первого медицинского университета был проведен эксперимент целью, которого была демонстрация возможности определения отличия масс-спектров ЛОС образцов мочи у детей с врожденными уропатиями от масс-спектров образцов мочи здоровых детей.

Заболевания почек занимают лидирующие позиции в структуре всей патологии у детей, встречаясь в популяции с частотой от 5,4% до 32,5% [168]. Первичный пузырно-мочеточниковый рефлюкс относится к группе диспластических заболеваний почек и является одной из наиболее распространенных врожденных уропатий у детей, приводящих к развитию рефлюкс-нефропатии и хронической болезни почек, которая достигает конечной стадии у 25-60% пациентов. Диагностика повреждения почек в настоящее время основывается на анализе жидкой пробы мочи и крови. К ним относятся определение уровня сывороточного креатинина, альбуминурии, скорости клубочковой фильтрации. Однако эти методы диагностики не являются в достаточной мере чувствительными и специфичными и не отражают полную картину повреждения. Таким образом, на сегодняшний день, существуют трудности в диагностике раннего повреждения почек, что и определяет потребность в поиске и разработке новой методов диагностики повреждения почек. В эксперименте использовались пробы мочи 49 пациентов: 30 пациентов с врожденными уропатиями (16 проб - пузырно-мочеточниковый рефлюкс, 6 проб - мегауретер, 1 проба - гидронефроз) и 19 пациентов без заболеваний мочевыделительной системы (пациентов с малой хирургической патологией), которые составили контрольную группу. Сбор проб мочи осуществлялся до начала лечения. Перед измерениями образцы, хранившиеся до начала эксперимента при температуре -18С, размораживали при комнатной температуре в течении 10 минут. Пробы разливались по микроцентрифужным пробиркам порциями по 20 мкл. Методика проведения эксперимента не отличалась от описанного ранее в эксперименте с мышиной уриной. Характерные масс-спектры ЛОС мочи показаны на Рисунке 44.

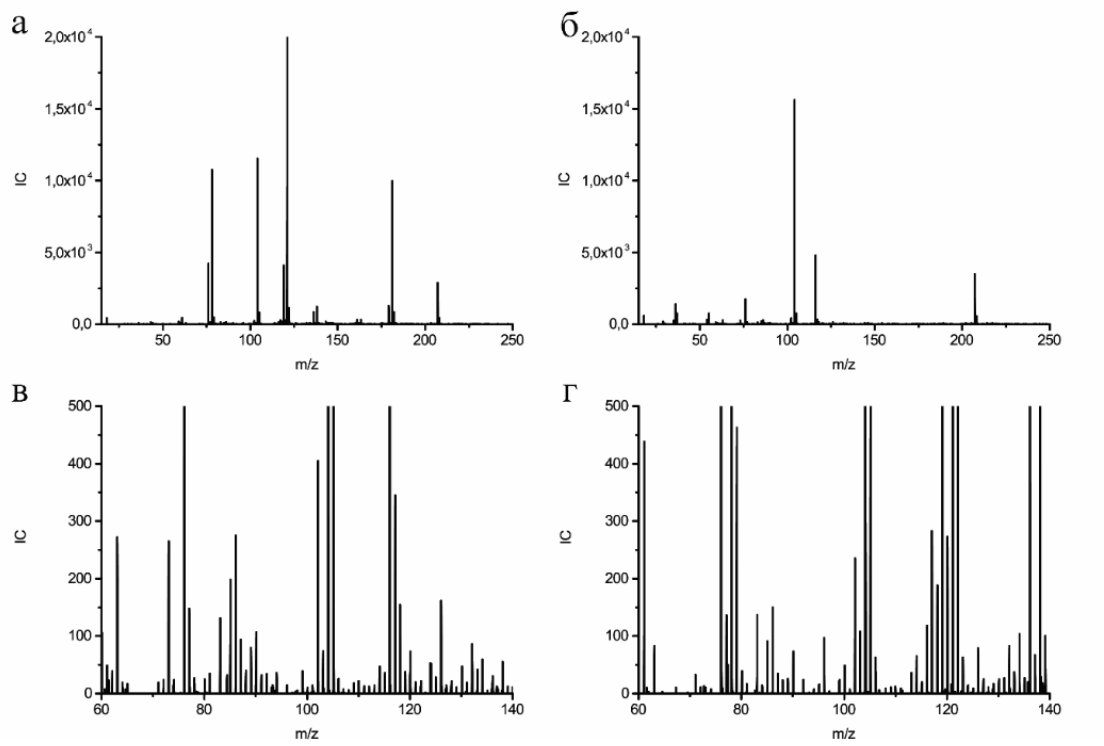

Рисунок 44 – Масс-спектры ЛОС человеческой урины: а, б – масс-спектры ЛОС мочи. в,г – увеличенные участки масс-спектров, демонстрирующие наличие масс-спектров ЛОС с небольшой интенсивностью.

Обработка масс-спектра проводилась в программном пакете MatLab2019 следующим образом: значимыми пиками мы считали пики в суммарном масс-спектре с амплитудой, соответствующей регистрации в среднем не менее 1 иона в единичном масс-спектре что соответствует не менее 100 ионам в суммарном масс-спектре, полученному за 1 секунду. В регистрируемом диапазоне масс 1 - 500 а.е.м было выделено 339 уникальных пиков, которые присутствуют почти во всех образцах. К сожалению, разрешение используемого в работе масс-спектрометра не позволяет идентифицировать соединения, соответствующие найденным пикам, а пики могут соответствовать не только химическим соединениям, но и их фрагментам и кластерам. Мы не можем также исключить интерференцию. Для выделения из полученного массива пиков, содержащих информацию о наличии или отсутствии заболевания ко всему массиву данных, был применен метод одностороннего дисперсионного анализа. Целью одностороннего дисперсионного анализа является определение различия между средними значениями пиков в масс-спектрах группы больных и группы здоровых пациентов с помощью сравнения внутригрупповой и межгрупповой дисперсий. В качестве примера на Рисунке 45 приведены ящичные диаграммы данных для пиков с m/z = 67 и m/z = 150. с различными медианными значениями для двух групп.

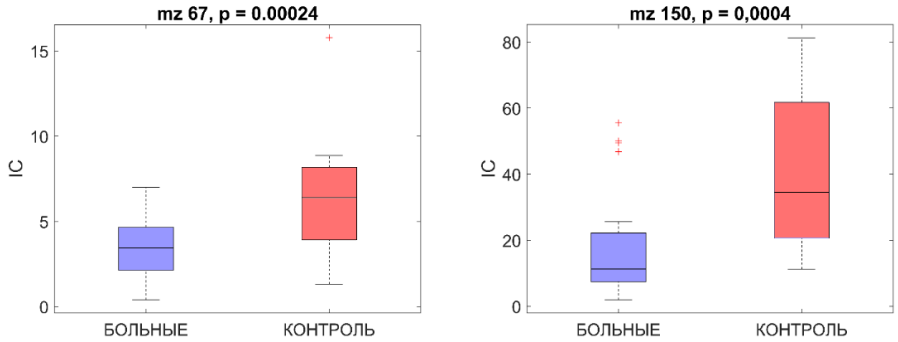

Рисунок 45 - Диаграммы типа «ящик с усами» для пиков с m/z 67 и m/z 150

Дисперсионный анализ показал, что в массиве из 339 пиков существует всего 11 пиков с $p<0.005$, по которым можно отличить одну группу от другой. Для визуализации к одинадцати полученным пикам был применен метод главных компонент. Результат применения метода представлен на Рисунке 46. Разделение областей проводилось дискриминантным анализом [169]. Как видно из Рисунка 46 на графике в координатах двух первых главных компонент наблюдается разделение двух групп пациентов. Это говорит о том, что в ЛОС, собираемых над поверхностью пробы мочи при комнатной температуре, содержится информация о состоянии пациента и эта информация может быть использована для целей диагностики заболеваний.

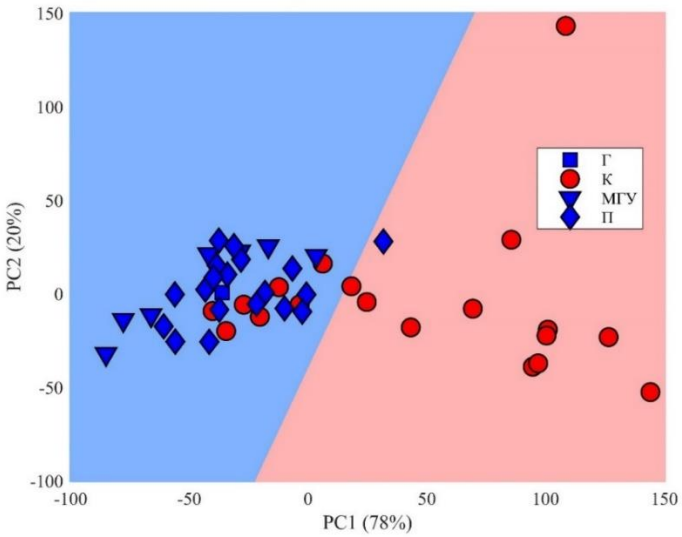

Рисунок 46 - Отображение результатов в координатах первых двух главных компонент. Красные кружки - контрольная группа, синие квадраты – гидронефроз - 1, синие треугольники – мегауретер - 6, синие ромбы – мочеточниковый рефлюкс - 19.

Очевидно, что для более полного разделения проб необходимо увеличить объем выборки и стратифицировать пациентов как в контрольной группе, так и в группе больных по полу и возрасту. Необходимость стратификации определяется тем, что в составе ЛОС кроме изменений,

связанных с заболеванием, наблюдаются возрастные изменения состава. Проведенное исследование показало, что масс-спектрометрический анализ летучих компонентов мочи проводимое без пробоподготовки, в состоянии образца «как он есть» потенциально может иметь диагностическое применение. Достоинством метода является минимальное время анализа, недостижимое при использовании широко применяемых для подобных исследование хромато масс-спектрометров.

Проведенный дисперсионный анализ показал, что в регистрируемых масс-спектрах существует набор пиков, по которым возможно разделение групп здоровые – больные. Было выделено 11 пиков, имеющих p-значение меньше 0,005. На самом деле количество таких пиков значительно больше, но, как отмечено выше, их присутствие маскируется интерференцией в масс-спектрах, связанной с недостаточным разрешением прибора.

Это исследование демонстрирует потенциал волатомики для диагностики болезней. Такой подход по детектированию болезни по образцам мочи человека, могут вдохновить на разработку недорогого, точного и неинвазивного биологического теста на широкий класс болезней.

Выводы к главе 3

В данной главе продемонстрировано применение метода APLPI MS для анализа реальных объектов: пищевых продуктов и биологических жидкостей животных и человека. На примере йогурта, показана возможность применения метода для получения воспроизводимых масс-спектров ЛОС реальных пищевых продуктов и применимости для дифференциации типа. На примере кофе получены масс-спектры продуктов имеющий сложный состав ЛОС и возможность идентифицировать пробу по масс-спектру.

Эксперименты по анализу биологических жидкостей животных и человека показали применимость метода для анализа ЛОС без пробоподготовки при нормальных условиях. Обнаруженные различия подтверждают предположение о возможном применении разработанного метода для определения патологических изменений организма [170–172].

Разработанный метод APLPI обеспечивает получение масс-спектрометрической информации при анализе летучих органических соединений, выделяемых живыми организмами, достаточной для поиска и выявления патологических изменений. Новый метод ионизации летучих органических соединений, обеспечивает эффективную ионизацию различных химических соединений. Сочетание математических методов обработки масс-спектрометрических данных позволяет выделить отличия между анализируемыми группами.

К достоинствам метода относятся: минимальное время анализа и возможность анализировать объекты «как они есть», то есть без пробоподготовки.

Заключение

Основные научные результаты, полученные автором, состоят в следующем:

1. Разработан метод лазерного масс-спектрометрического анализа летучих органических соединений, выделяемых жидкими биологическими образцами, обеспечивающий получение результатов без пробоподготовки. Создан ионный источник для анализа ЛОС.

2. Проведен выбор параметров излучения Nd:YAG лазера для создания лазерной плазмы, обеспечивающей эффективную ионизацию ЛОС. Показано, что для разработанного источника ионов достаточна энергия в импульсе Nd:YAG лазера (λ=1.06 мкм) 250 мкДж при плотности энергии в пятне 35 Дж/см^2. Определена длительность и спектральный диапазон импульса УФ излучения генерируемой лазерной плазмы.

3. Показано, что основными каналами образования положительных ионов органических соединений под действием излучения лазерной плазмы при атмосферном давлении являются: фотоионизация, реакция передачи протона, реакция электрофильного присоединения, реакция окисления с последующей ионизацией.

4. Показано, что эффективность образования положительных ионов ЛОС от 2 до 100 раз выше в аргоне по сравнению с азотом и воздухом. Более эффективная ионизация в аргоне обусловлена отсутствием поглощения жесткого УФ излучения с энергией кванта, превышающей потенциал ионизации молекулы H_2O.

5. Определены основные характеристики метода: чувствительность от $2{,}5\times10^3$ до $4{,}6\times10^4$ отсчетов/ppbv и предел обнаружения от 200 ppt. Сравнение с известными методами ионизации (SIFT и PTR) показывает, что метод APLPI по чувствительности превышает указанные методы. Определена вероятность образования ионов, находящаяся в диапазоне от $7{,}2\times10^{-6}$ до $1{,}5\times10^{-5}$ для ряда аналитов.

6. Получены масс-спектры ЛОС образцов биологических жидкостей животных и человека при комнатной температуре образца в аргоне при атмосферном давлении. На примере анализа образцов мочи показано, что масс-спектры ЛОС содержат информацию о патологических изменениях в организме.

Результаты, полученные в ходе исследования, могут способствовать развитию технологии анализа летучих органических соединений без пробоподготовки при атмосферном давлении.

Несмотря на достаточно «жесткие» условия, лазерная плазма при атмосферном давлении обеспечивает «мягкую» ионизацию органических соединений. Состав ионов, регистрируемых в масс-спектрах, определяется, в основном, процессами столкновений первичных ионов и возбужденных атомов и молекул, образованных при импульсном воздействии жесткого УФ излучения, с нейтральными молекулами аналитов.

Список используемых сокращений

МС – Масс-спектрометрия

ЛОС – Летучие Органические Соединения

DART - Direct analysis in real time

SESI – Secondary Electrospray Ionization

APLPI – Atmospheric Pressure Laser Plasma Ionization

PTR – Proton Transfer Reaction

SIMS – Secondary Ion Ma

ГХ – Газовая Хроматография

m/z – отношение массы к заряду

Да – Дальтон

ХИАД – Химическая Ионизация при Атмосферном Давлении

APPI – Atmospheric Pressure Photo Ionization

ALADIN – Airborne laser-spark for ambient desorption/ionization

LIBS – Laser Induced Breakdown spectroscopy

LOD – Limit of Detection

PCA – Principal Component Analysis

Список цитируемой литературы

1. Pento A.V. et al. Laser ablation and ionisation by laser plasma radiation in the atmospheric-pressure mass spectrometry of organic compounds // Quantum Electron. 2013. Vol. 43, № 1. P. 55–59.
2. Drabinska N. et al. A literature survey of volatiles from the healthy human breath and bodily fluids: the human volatilome // Journal of Breath Research. IOP Publishing, 2021.
3. Галимов Э. Аналитическая химия. 1979.
4. Макаров В. et al. Применение оптико-спектральных методов для неинвазивной оценки накопления наночастиц в биологических тканях in vivo // Российский химический журнал. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего …, 2013. Vol. 57, № 2. P. 119–123.
5. Першин С.М. et al. Способ лидарного зондирования и устройство для его осуществления. 2019.
6. Могилевский А. et al. СЕНСОР ПАРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ. 1998.
7. Röck F., Barsan N., Weimar U. Electronic nose: current status and future trends // Chemical reviews. ACS Publications, 2008. Vol. 108, № 2. P. 705–725.
8. Blake R.S., Monks P.S., Ellis A.M. Proton-Transfer Reaction Mass Spectrometry // Chem. Rev. 2009. Vol. 109, № 3. P. 861–896.
9. Wan-Qi S., ZHANG Y., Shuang-Xi F. Application of vacuum ultraviolet single-photon ionization mass spectrometer in online analysis of volatile organic compounds // Chinese Journal of Analytical Chemistry. Elsevier, 2019. Vol. 47, № 7. P. 976–984.
10. Boesl U., Neusser H., Schlag E. Two-photon ionization of polyatomic molecules in a mass spectrometer // Zeitschrift für Naturforschung A. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, 1978. Vol. 33, № 12. P. 1546–1548.
11. Чернецова Е.С., Морлок Г.Е., Ревельский И.А. Масс-спектрометрия DART и ее применение в химическом анализе // Успехи химии. Автономная некоммерческая организация Издательство Журнала Успехи химии, 2011. Vol. 80, № 3. P. 249–271.
12. Ревельский И. et al. Масс-спектрометрический анализ с фотоионизацией при атмосферном давлении н-алканов, спиртов, кетонов, сложных эфиров и аминов // Изв. Акад. наук СССР, сер. хим. 1986. № 9. P. 1987.
13. Hoffman E. de, Stroobant V. Mass spectrometry: principles and applications // West Sussex: John Wiley & Sons, Bruxellas, Bélgica. 2007. Vol. 1, № 2. P. 85.
14. Robb D.B., Covey T.R., Bruins a P. Atmospheric pressure photoionisation: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry // Analytical Chemistry. 2000. Vol. 72, № 15. P. 3653–3659.
15. Bos S.J., van Leeuwen S.M., Karst U. From fundamentals to applications: recent developments in atmospheric pressure photoionization mass spectrometry // Analytical and bioanalytical chemistry. Springer, 2006. Vol. 384, № 1. P. 85–99.
16. Penning F. Über ionisation durch metastabile atome // Naturwissenschaften. 1927. Vol. 15, № 40. P. 818–818.
17. Cody R.B. et al. Direct analysis in real time (DART) mass spectrometry // JEOL news. 2005. Vol. 40, № 1. P. 8–12.
18. Cody R.B., Laramée J.A., Durst H.D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions // Analytical chemistry. ACS Publications, 2005. Vol. 77, № 8. P. 2297–2302.
19. Song L. et al. Ionization mechanism of positive-ion direct analysis in real time: a transient microenvironment concept // Analytical chemistry. ACS Publications, 2009. Vol. 81, № 24. P. 10080–10088.
20. Райзер Ю.П. Физика газового разряда. Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1987.

21. Carroll D. et al. Subpicogram detection system for gas phase analysis based upon atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry // Analytical chemistry. ACS Publications, 1974. Vol. 46, № 6. P. 706–710.
22. Holčapek M., Jirásko R., Lísa M. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules // Journal of Chromatography A. Elsevier, 2010. Vol. 1217, № 25. P. 3908–3921.
23. Alexandrov M. et al. Ion extraction from solutions at atmospheric-pressure-a method of mass-spectrometric analysis of bioorganic substances [in Russisch] // Dok Akad Nauk SSSR. 1984. Vol. 277, № 2. P. 379–383.
24. Yamashita M., Fenn J.B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme // The Journal of Physical Chemistry. ACS Publications, 1984. Vol. 88, № 20. P. 4451–4459.
25. Rayleigh, Lord. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity // The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science. Taylor & Francis, 1882. Vol. 14, № 87. P. 184–186.
26. Zeleny J. The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces // Physical Review. APS, 1914. Vol. 3, № 2. P. 69.
27. Taylor G.I. Disintegration of water drops in an electric field // Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences. The Royal Society London, 1964. Vol. 280, № 1382. P. 383–397.
28. Martínez-Lozano P. et al. Secondary electrospray ionization (SESI) of ambient vapors for explosive detection at concentrations below parts per trillion // Journal of the American Society for Mass Spectrometry. Springer, 2009. Vol. 20, № 2. P. 287–294.
29. Fenn J.B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules // Science. American Association for the Advancement of Science, 1989. Vol. 246, № 4926. P. 64–71.
30. Wu C., Siems W.F., Hill H.H. Secondary electrospray ionization ion mobility spectrometry/mass spectrometry of illicit drugs // Analytical chemistry. ACS Publications, 2000. Vol. 72, № 2. P. 396–403.
31. Rioseras A.T., Gaugg M.T., Sinues P.M.-L. Secondary electrospray ionization proceeds via gas-phase chemical ionization // Analytical Methods. Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 9, № 34. P. 5052–5057.
32. Blanco F.G., Vidal-de-Miguel G. Breath Analysis by Secondary Electro-Spray Ionization-Mass Spectrometry to Interrogate Biologically Significant Metabolites Non-Invasively // Critical Reviews in Analytical Chemistry. Taylor & Francis, 2021. P. 1–13.
33. Martínez-Lozano P., de La Mora J.F. Electrospray ionization of volatiles in breath // International Journal of Mass Spectrometry. Elsevier, 2007. Vol. 265, № 1. P. 68–72.
34. Chen H., Wortmann A., Zenobi R. Neutral desorption sampling coupled to extractive electrospray ionization mass spectrometry for rapid differentiation of biosamples by metabolomic fingerprinting // Journal of Mass Spectrometry. Wiley Online Library, 2007. Vol. 42, № 9. P. 1123–1135.
35. Adams N., Smith D. The selected ion flow tube (SIFT); a technique for studying ion-neutral reactions // International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics. Elsevier, 1976. Vol. 21, № 3–4. P. 349–359.
36. Smith D., Španěl P. Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis // Mass Spectrom. Rev. 2005. Vol. 24, № 5. P. 661–700.
37. Hansel A. et al. Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level // International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes. 1995. Vol. 149–150. P. 609–619.
38. Lagg A. et al. Applications of proton transfer reactions to gas analysis // International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes. Elsevier, 1994. Vol. 134, № 1. P. 55–66.

39. Aghaei M., Mehrabian S., Tavassoli S. Simulation of nanosecond pulsed laser ablation of copper samples: A focus on laser induced plasma radiation // Journal of Applied Physics. American Institute of Physics, 2008. Vol. 104, № 5. P. 053303.
40. Borghese A., Merola S.S. Time-resolved spectral and spatial description of laser-induced breakdown in air as a pulsed, bright, and broadband ultraviolet–visible light source // Appl. Opt. 1998. Vol. 37, № 18. P. 3977.
41. Liu H. et al. Early phase laser induced plasma diagnostics and mass removal during single-pulse laser ablation of silicon // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 1999. Vol. 54, № 11. P. 1607–1624.
42. Farid N. et al. Emission features and expansion dynamics of nanosecond laser ablation plumes at different ambient pressures // Journal of applied physics. American Institute of Physics, 2014. Vol. 115, № 3. P. 033107.
43. Bierstedt A. et al. Characterization of an Airborne Laser-Spark Ion Source for Ambient Mass Spectrometry // Anal. Chem. 2017. Vol. 89, № 6. P. 3437–3444.
44. Aragón C., Aguilera J.A. Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 2008. Vol. 63, № 9. P. 893–916.
45. Snow K.B., Thomas T.F. Mass spectrum, ionization potential, and appearance potentials for fragment ions of sulfuric acid vapor // International journal of mass spectrometry and ion processes. Elsevier, 1990. Vol. 96, № 1. P. 49–68.
46. Hunter E.P.L., Lias S.G. Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules: An Update // Journal of Physical and Chemical Reference Data. 1998. Vol. 27, № 3. P. 413–656.
47. Bierstedt A., Riedel J. Airborne Laser-Spark for Ambient Desorption/Ionisation // Eur J Mass Spectrom (Chichester). 2016. Vol. 22, № 3. P. 105–114.
48. Amoruso S. et al. Characterization of laser-ablation plasmas // Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. IOP Publishing, 1999. Vol. 32, № 14. P. R131.
49. Hermann J. et al. Multistage plasma initiation process by pulsed CO2 laser irradiation of a Ti sample in an ambient gas (He, Ar, or N2) // Journal of applied physics. American Institute of Physics, 1993. Vol. 73, № 3. P. 1091–1099.
50. Vorob'ev V.S. Plasma arising during the interaction of laser radiation with solids // Physics-Uspekhi. IOP Publishing, 1993. Vol. 36, № 12. P. 1129.
51. Svelto O., Hanna D.C. Principles of lasers, 4-th ed. Springer, 1998.
52. Born M., Wolf E. Principles of optics. Cambrige: Camprige University Press, 1999.
53. Keldysh L. V, others. Ionization in the field of a strong electromagnetic wave: article // Sov. Phys. JETP. 1965. Vol. 20, № 5. P. 1307–1314.
54. Schaffer C.B., Brodeur A., Mazur E. Laser-induced breakdown and damage in bulk transparent materials induced by tightly focused femtosecond laser pulses // Measurement Science and Technology. IOP Publishing, 2001. Vol. 12, № 11. P. 1784.
55. Morgan C.G. Laser-induced breakdown of gases // Reports on Progress in Physics. IOP Publishing, 1975. Vol. 38, № 5. P. 621.
56. Choi Y. et al. Simulation and Measurement of the Laser Induced Breakdown in Air and Argon for Nanosecond Order Pulses // Internal Combustion Engine Division Fall Technical Conference. American Society of Mechanical Engineers, 2012. Vol. 55096. P. 757–765.
57. Du D. et al. Laser-induced breakdown from 7 ns to 150 fs by impact ionization in Si02 with pulse widths // Applied Physics Letters. 2001. Vol. 64, № 23. P. 3071–3073.
58. Jia T.Q. et al. Mechanisms in fs-laser ablation in fused silica: article // Journal of applied physics. AIP, 2004. Vol. 95, № 9. P. 5166–5171.
59. Cardona M., Peter Y.Y. Fundamentals of semiconductors. Springer, 2005. Vol. 619.
60. Vogel A. et al. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues // Applied Physics B: Lasers and Optics. 2005. Vol. 81, № 8. P. 1015–1047.

61. Glezer E.N., Mazur E. Ultrafast-laser driven micro-explosions in transparent materials: article // Applied Physics Letters. AIP, 1997. Vol. 71, № 7. P. 882–884.
62. Ashkenasi D. et al. Fundamentals and advantages of ultrafast micro-structuring of transparent materials: article // Applied Physics A: Materials Science & Processing. Springer, 2003. Vol. 77, № 2. P. 223–228.
63. Schaffer C.B. et al. Laser-induced microexplosions in transparent materials: microstructuring with nanojoules: inproceedings // Optoelectronics-Integrated Optoelectronic Devices. 1999. P. 143–147.
64. Juodkazis S. et al. Laser-induced microexplosion confined in the bulk of a sapphire crystal: evidence of multimegabar pressures: article // Physical review letters. APS, 2006. Vol. 96, № 16. P. 166101.
65. Cirisan M. et al. Laser plasma plume structure and dynamics in the ambient air: The early stage of expansion // Journal of Applied Physics. 2011. Vol. 109, № 10. P. 103301.
66. Alimpiev S.S., Grechnikov A.A., Nikiforov S.M. New approaches to the laser mass spectrometry of organic samples // Physics-Uspekhi. IOP Publishing, 2015. Vol. 58, № 2. P. 191.
67. Зельдович Б., Райзер Ю. Физика ударных волн и высокотемпературных гидродинамических явлений. Рипол Классик, 2013.
68. Лукьянов С., Ковальский Н. Горячая плазма и управляемый ядерный синтез // М., МИФИ. 1999. P. 391–424.
69. Hahn D.W., Omenetto N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma– Particle Interactions: Still-Challenging Issues Within the Analytical Plasma Community. P. 32.
70. Hahn D.W., Omenetto N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields // Appl Spectrosc. 2012. Vol. 66, № 4. P. 347–419.
71. Li X. et al. The Influence of spot size on the expansion dynamics of nanosecond-laser-produced copper plasmas in atmosphere // Journal of Applied Physics. 2013. Vol. 113, № 24. P. 243304.
72. Radziemski L.J. From LASER to LIBS, the path of technology development // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 2002. Vol. 57, № 7. P. 1109–1113.
73. Baudelet M., Smith B.W. The first years of laser-induced breakdown spectroscopy // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 28, № 5. P. 624–629.
74. Noll R. Laser-induced breakdown spectroscopy // Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. Springer, 2012. P. 7–15.
75. Takahashi T., Thornton B. Quantitative methods for compensation of matrix effects and self-absorption in Laser Induced Breakdown Spectroscopy signals of solids // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 2017. Vol. 138. P. 31–42.
76. Carroll P., Kennedy E.T., Sullivan G. Laser-produced continua for absorption spectroscopy in the VUV and XUV // Applied Optics. Optica Publishing Group, 1980. Vol. 19, № 9. P. 1454–1462.
77. Kennedy E.T. et al. VUV/EUV ionising radiation and atoms and ions: dual laser plasma investigations // Radiation Physics and Chemistry. Elsevier, 2004. Vol. 70, № 1–3. P. 291–321.
78. Amann A. et al. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva // J. Breath Res. 2014. Vol. 8, № 3. P. 034001.
79. Casas-Ferreira A.M. et al. Non-separative mass spectrometry methods for non-invasive medical diagnostics based on volatile organic compounds: A review // Analytica Chimica Acta. 2019. Vol. 1045. P. 10–22.
80. Capuano R. et al. Simultaneous Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry and electronic nose study of the volatile compounds released by Plasmodium falciparum infected red blood cells in vitro // Sci Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 12360.
81. Majchrzak T. et al. Real-Time Volatilomics: A Novel Approach for Analyzing Biological Samples // Trends in Plant Science. 2020. Vol. 25, № 3. P. 302–312.
82. Španěl P., Smith D. Quantification of volatile metabolites in exhaled breath by selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS // Clinical Mass Spectrometry. 2020. Vol. 16. P. 18–24.

83. Willis C., Poulin R. Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes? // FOLIA PARASIT. 2000. Vol. 47, № 1. P. 6–10.
84. Kavaliers M., Choleris E., Pfaff D.W. Recognition and avoidance of the odors of parasitized conspecifics and predators: Differential genomic correlates // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2005. Vol. 29, № 8. P. 1347–1359.
85. Phillips M. et al. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath // Tuberculosis. 2007. Vol. 87, № 1. P. 44–52.
86. Dummer J. et al. Analysis of biogenic volatile organic compounds in human health and disease // TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2011. Vol. 30, № 7. P. 960–967.
87. Chambers S.T., Scott-Thomas A., Epton M. Developments in novel breath tests for bacterial and fungal pulmonary infection: // Current Opinion in Pulmonary Medicine. 2012. Vol. 18, № 3. P. 228–232.
88. Kimball B.A. et al. Avian Influenza Infection Alters Fecal Odor in Mallards // PLoS ONE / ed. Munster V.J. 2013. Vol. 8, № 10. P. e75411.
89. Kimball B.A. et al. Immunization alters body odor // Physiology & Behavior. 2014. Vol. 128. P. 80–85.
90. Kimball B.A., Wilson D.A., Wesson D.W. Alterations of the volatile metabolome in mouse models of Alzheimer’s disease // Sci Rep. 2016. Vol. 6, № 1. P. 19495.
91. Kimball B.A. et al. Brain Injury Alters Volatile Metabolome // CHEMSE. 2016. Vol. 41, № 5. P. 407–414.
92. Miekisch W., Schubert J.K., Noeldge-Schomburg G.F.E. Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds // Clinica Chimica Acta. 2004. Vol. 347, № 1–2. P. 25–39.
93. Phillips M. et al. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus // Clinica Chimica Acta. 2004. Vol. 344, № 1–2. P. 189–194.
94. Boots A.W. et al. The versatile use of exhaled volatile organic compounds in human health and disease // J. Breath Res. 2012. Vol. 6, № 2. P. 027108.
95. de Lacy Costello B. et al. A review of the volatiles from the healthy human body // J. Breath Res. 2014. Vol. 8, № 1. P. 014001.
96. Лисица А.В. et al. Постгеномная медицина: альтернатива биомаркерам // Вестник Российской академии медицинских наук. 2016. Vol. 71, № 3. P. 255–260.
97. Chiappin S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation // Clinica chimica acta. Elsevier, 2007. Vol. 383, № 1–2. P. 30–40.
98. Kaufman E., Lamster I.B. The diagnostic applications of saliva—a review // Critical Reviews in oral biology & medicine. SAGE Publications, 2002. Vol. 13, № 2. P. 197–212.
99. Kidwell D.A., Holland J.C., Athanaselis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. Elsevier, 1998. Vol. 713, № 1. P. 111–135.
100. Pfaffe T. et al. Diagnostic potential of saliva current state and future applications // Clinical chemistry. Oxford University Press, 2011. Vol. 57, № 5. P. 675–687.
101. Nagler R.M. et al. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool // Journal of investigative medicine. BMJ Publishing Group Limited, 2002. Vol. 50, № 3. P. 214–225.
102. Garner C.E. et al. Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease // FASEB j. 2007. Vol. 21, № 8. P. 1675–1688.
103. Probert C.S. et al. Volatile organic compounds as diagnostic biomarkers in gastrointestinal and liver diseases // Journal of Gastrointestinal and Liver Disease. 2009. Vol. 18, № 3.
104. Dormont L., Bessière J.-M., Cohuet A. Human skin volatiles: a review // Journal of chemical ecology. Springer, 2013. Vol. 39, № 5. P. 569–578.
105. Abaffy T. et al. Comparative analysis of volatile metabolomics signals from melanoma and benign skin: a pilot study // Metabolomics. Springer, 2013. Vol. 9, № 5. P. 998–1008.

106. Hintikka L. et al. Analysis of anabolic steroids in urine by gas chromatography-microchip atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry with chlorobenzene as dopant // Journal of Chromatography A. 2013. Vol. 1312, № November 2017. P. 111–117.
107. Woollam M. et al. Detection of Volatile Organic Compounds (VOCs) in Urine via Gas Chromatography-Mass Spectrometry QTOF to Differentiate Between Localized and Metastatic Models of Breast Cancer // Sci Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 2526.
108. Suni N.M. et al. Analytica Chimica Acta Matrix effect in the analysis of drugs of abuse from urine with desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry (DAPPI-MS) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS) // Analytica Chimica Acta. Elsevier B.V., 2011. Vol. 699, № 1. P. 73–80.
109. Turner C., Španěl P., Smith D. A longitudinal study of ammonia, acetone and propanol in the exhaled breath of 30 subjects using selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS // Physiol. Meas. 2006. Vol. 27, № 4. P. 321–337.
110. Broza Y.Y. et al. Hybrid Volatolomics and Disease Detection // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. Vol. 54, № 38. P. 11036–11048.
111. Free A.H., Free H.M. Urinalysis in clinical laboratory practice. Crc Press, 2018.
112. Shaikh N., Hafeez S., Baig M. Spectroscopic studies of Ca plasma generated by the fundamental, second, and third harmonics of a Nd: YAG laser // Spectrochim. Acta B. 2007. Vol. 62, № 1311. P. 10–1016.
113. Sdorra W., Brust J., Niemax K. Basic investigations for laser microanalysis: IV. The dependence on the laser wavelength in laser ablation // Microchimica Acta. Springer, 1992. Vol. 108, № 1. P. 1–10.
114. Ablizen R. et al. Ion Dynamics in an Atmospheric Source with Photoionization by Radiation of Laser Plasma // Technical Physics. Springer, 2020. Vol. 65, № 12. P. 1905–1911.
115. Аблизен Р., Пенто А., Бухарина А. Математическое моделирование динамики ионов в атмосферном ионном источнике с импульсной фотоионизацией излучением лазерной плазмы // Тезисы докладов Школы-конференции молодых ученых «Прохоровские недели». Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный …, 2019. № 1. P. 64–66.
116. De Giacomo A. et al. The role of continuum radiation in laser induced plasma spectroscopy // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 2010. Vol. 65, № 5. P. 385–394.
117. Zhang S. et al. Laser-induced plasma temperature // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Elsevier, 2014. Vol. 97. P. 13–33.
118. Kramida A., Ralchenko Y., Reader J. NIST Atomic Spectra Database (ver. 5.6.1), [Electronic resource]. URL: https://www.nist.gov/pml/atomic-spectra-database.
119. Ma Q. et al. Experimental investigation of the structure and the dynamics of nanosecond laser-induced plasma in 1-atm argon ambient gas // Applied Physics Letters. American Institute of Physics, 2013. Vol. 103, № 20. P. 204101.
120. Amoruso S., Schou J., Lunney J.G. Influence of the atomic mass of the background gas on laser ablation plume propagation // Applied Physics A. Springer, 2008. Vol. 92, № 4. P. 907–911.
121. Amoruso S., Schou J., Lunney J. Multiple-scattering effects in laser ablation plume propagation in gases // EPL (Europhysics Letters). IOP Publishing, 2006. Vol. 76, № 3. P. 436.
122. Watanabe K. Ultraviolet absorption processes in the upper atmosphere // Advances in geophysics. Elsevier, 1958. Vol. 5. P. 153–221.
123. Chan W. et al. Absolute optical oscillator strengths for the electronic excitation of atoms at high resolution. III. The photoabsorption of argon, krypton, and xenon // Physical Review A. APS, 1992. Vol. 46, № 1. P. 149.
124. Chan W. et al. Absolute optical oscillator strengths for discrete and continuum photoabsorption of molecular nitrogen (11–200 eV) // Chemical physics. Elsevier, 1993. Vol. 170, № 1. P. 81–97.

125. Brinkmann R.T. Dissociation of water vapor and evolution of oxygen in the terrestrial atmosphere // J. Geophys. Res. 1969. Vol. 74, № 23. P. 5355–5368.
126. Смирнов Б.М. Процессы ионизации при медленных столкновениях атомов. Успехи физических наук, 1981.
127. Cernogora G. et al. Population of N2 (A 3Σu+) metastable states in a pure nitrogen glow discharge // Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics (1968-1987). IOP Publishing, 1981. Vol. 14, № 16. P. 2977.
128. Fabelinsky V.I. et al. Laser Plasma on Metal Target Surface as a Source of Vacuum UV Radiation for Ionizing Organic Molecules in Mass Spectroscopy // Phys. Wave Phen. 2021. Vol. 29, № 3. P. 210–220.
129. Holmes J.L., van Huizen N.A., Burgers P.C. Proton affinities and ion enthalpies // European Journal of Mass Spectrometry. SAGE Publications Sage UK: London, England, 2017. Vol. 23, № 6. P. 341–350.
130. Бухарина А. et al. Ионизация излучением лазерной плазмы в масс-спектрометрическом анализе биологических объектов при атмосферном давлении // VIII Международная конференция по фотонике и информационной оптике. 2019. P. 569–570.
131. Сидоров А., Бухарина А., Пенто А. Масс-спектрометрический анализ спиртов с ионизацией излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении в газах // Лазерные, плазменные исследования и технологии ЛАПЛАЗ-2019. 2019. P. 284–285.
132. Lin B., Sunner J. Ion transport by viscous gas flow through capillaries // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994. Vol. 5, № 10. P. 873–885.
133. Pento A.V. et al. Laser-induced plasma on a metal surface for ionization of organic compounds at atmospheric pressure // International Journal of Mass Spectrometry. Elsevier, 2021. Vol. 461. P. 116498.
134. Сидоров А. et al. Сравнение эффективности ионизации излучением лазерной плазмы и химической ионизации в масс-спектрометрии органических соединений // IX Международная конференция по фотонике и информационной оптике. 2019. P. 505–506.
135. Бухарина А.Б., Пенто А.В. Пределы обнаружения метода лазерной масс-спектрометрии APLPI // Тезисы докладов Школы-конференции молодых ученых «Прохоровские недели». Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный …, 2020. № 1.
136. Bukharina A.B. et al. Mass spectrometry of volatile organic compounds ionised by laser plasma radiation // Quantum Electronics. IOP Publishing, 2021. Vol. 51, № 5. P. 393.
137. Evard H., Kruve A., Leito I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review // Analytica Chimica Acta. 2016. Vol. 942. P. 23–39.
138. Evard H., Kruve A., Leito I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part II: Practical aspects // Analytica Chimica Acta. 2016. Vol. 942. P. 40–49.
139. Evard D.H., Kruve D.A., Leito I. Tutorial on estimating the limit of detection using LC- MS analysis. P. 12.
140. Пенто А.В. et al. Ионизация органических соединений излучением лазерной плазмы в газах при атмосферном давлении. г. Москва, 2021.
141. Sekimoto K. et al. Calculation of the sensitivity of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) for organic trace gases using molecular properties // International Journal of Mass Spectrometry. 2017. Vol. 421. P. 71–94.
142. Yuan B. et al. A high-resolution time-of-flight chemical ionization mass spectrometer utilizing hydronium ions (H 3 O+ ToF-CIMS) for measurements of volatile organic compounds in the atmosphere // Atmospheric Measurement Techniques. Copernicus GmbH, 2016. Vol. 9, № 6. P. 2735–2752.
143. Lehnert A.-S. et al. Performance of SIFT-MS and PTR-MS in the measurement of volatile organic compounds at different humidities: preprint. Gases/Laboratory Measurement/Validation and Intercomparisons, 2019.

144. Lehnert A.-S. et al. SIFT-MS optimization for atmospheric trace gas measurements at varying humidity // Atmospheric Measurement Techniques. Copernicus GmbH, 2020. Vol. 13, № 7. P. 3507–3520.
145. Romano A., Hanna G.B. Identification and quantification of VOCs by proton transfer reaction time of flight mass spectrometry: an experimental workflow for the optimization of specificity, sensitivity, and accuracy // Journal of Mass Spectrometry. Wiley Online Library, 2018. Vol. 53, № 4. P. 287–295.
146. Atkinson A. et al. Biomarkers Definitions Working Group // Clin. Pharmacol. Ther. 2001. Vol. 69. P. 89–95.
147. Liebal U.W. et al. Machine Learning Applications for Mass Spectrometry-Based Metabolomics // Metabolites. 2020. Vol. 10, № 6. P. 243.
148. Bioinformatics Methods in Clinical Research / ed. Matthiesen R. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. Vol. 593.
149. He Z., Yu W. Stable Feature Selection for Biomarker Discovery // arXiv:1001.0887 [cs, q-bio]. 2010.
150. Pearson K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space // The London, Edinburgh, and Dublin philosophical magazine and journal of science. Taylor & Francis, 1901. Vol. 2, № 11. P. 559–572.
151. Sylvester J.J. On the reduction of a bilinear quantic of the nth order to the form of a sum of n products by a double orthogonal substitution // Messenger of Mathematics. 1889. Vol. 19, № 6. P. 42–46.
152. Gorban A.N. et al. Principal manifolds for data visualization and dimension reduction. Springer, 2008. Vol. 58.
153. Springer Handbook of Odor / ed. Buettner A. Cham: Springer International Publishing, 2017.
154. Lytou A.E., Panagou E.Z., Nychas G.-J.E. Volatilomics for food quality and authentication // Current Opinion in Food Science. 2019. Vol. 28. P. 88–95.
155. Perez-Hurtado P. et al. Direct analysis of volatile organic compounds in foods by headspace extraction atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry // Rapid Commun Mass Spectrom. 2017. Vol. 31, № 22. P. 1947–1956.
156. Zhang X., Ren X., Chingin K. Applications of direct analysis in real time mass spectrometry in food analysis: A review // Rapid Commun Mass Spectrom. 2021. Vol. 35, № 6.
157. Zhang K. et al. Dopant-assisted atmospheric pressure photoionization of patulin in apple juice and apple-based food with liquid chromatography-tandem mass spectrometry // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2014. Vol. 62, № 18. P. 4112–4118.
158. Yoshioka N. et al. Rapid determination of five post-harvest fungicides and metabolite in citrus fruits by liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure photoionization // Food Control. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 21, № 2. P. 212–216.
159. Кравец К. et al. Ионизация органических соединений в условиях воздействия излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении. // Mass-spektrometria. 2020. Vol. 17, № 4.
160. Dias R.C.E. et al. Roasting process affects the profile of diterpenes in coffee // Eur Food Res Technol. 2014. P. 10.
161. Czech H. et al. Resolving Coffee Roasting-Degree Phases Based on the Analysis of Volatile Compounds in the Roasting Off-Gas by Photoionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (PI-TOFMS) and Statistical Data Analysis: Toward a PI-TOFMS Roasting Model // J. Agric. Food Chem. 2016. Vol. 64, № 25. P. 5223–5231.
162. Bukharina A. et al. Laser mass spectrometry for biological tissue analysis and pathology identification // 2018 International Conference Laser Optics (ICLO). IEEE, 2018. P. 469.
163. Pedregosa F. et al. Scikit-learn Machine Learning in Python // Journal of Machine Learning Research. 2011. Vol. 12. P. 2825–2830.

164. Bukharina A.B. et al. Laser mass spectrometry of volatile organic compounds for diagnosis of pathological processes // 2020 International Conference Laser Optics (ICLO). Saint Petersburg, Russia: IEEE, 2020. P. 1–1.
165. Kochevalina M.Y. et al. Change in Urine Odor of Mice in the Dynamics of Formation of a Transplanted Hepatocarcinoma H33 Tumor // Biology Bulletin. Springer, 2020. Vol. 47, № 5. P. 506–513.
166. Kochevalina M. et al. Influence of model hepatocarcinoma development time on sick animals' detection by dogs and laser mass spectrometer // CHEMICAL SENSES. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, 2020. Vol. 45, № 2. P. 163–163.
167. Kochevalina M.Y. et al. Changes in the urine volatile metabolome throughout growth of transplanted hepatocarcinoma // Scientific Reports. Nature Publishing Group, 2022. Vol. 12, № 1. P. 1–10.
168. Morris A.P. et al. Trans-ethnic kidney function association study reveals putative causal genes and effects on kidney-specific disease aetiologies // Nature communications. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 10, № 1. P. 1–14.
169. Guo Y., Hastie T., Tibshirani R. Regularized linear discriminant analysis and its application in microarrays // Biostatistics. Oxford University Press, 2007. Vol. 8, № 1. P. 86–100.
170. Бухарина А., Пенто А., Аблизен Р. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений для применения в постгеномной медицине // Тезисы докладов Школы-конференции молодых ученых «Прохоровские недели». Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный …, 2019. № 1. P. 73–74.
171. Бухарина А.Б., Яковлев В., Пенто А.В. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений мочи детей с врождёнными уропатиями // Тезисы докладов Школы-конференции молодых ученых «Прохоровские недели». Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный …, 2021. № 1. P. 103–105.
172. Яковлев В. et al. Анализ спектров летучих органических соединений и биомаркеров повреждения почек в моче у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом // Санкт-Петербургские научные чтения-2019. 2019. P. 338–338.

Список публикаций автора по теме диссертационной работы

1. **Bukharina A.**, Pento A., Nikiforov S., Alimpiev S., Simanovsky Y., Grechnikov A., Laser mass spectrometry for biological tissue analysis and pathology identification// 2018 International Conference Laser Optics (ICLO), St. Petersburg, 2018, pp. 469-469.

2. Kochevalina M., Rodionova E., Morozova O., Nikiforov S., Pento A., **Bukharina A**. Influence of model hepatocarcinoma development time on sick animals' detection by dogs and laser mass spectrometer // CHEMICAL SENSES. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, 2020. Vol. 45, № 2. P. 163–163.

3. **Bukharina A.**, Kochevalina M., Pento A., Simanovsky Ya., Rodionova E., Nikiforov S. Laser mass spectrometry of volatile organic compounds for diagnosis of pathological processes // 19th International Conference Laser Optics (ICLO 2020), Saint-Petersburg.

4. Ablizen R., Monastyrskiy M., Skoblin M., Pento, A., **Bukharina, A**., Nikiforov S., Makarov A. Ion Dynamics in an Atmospheric Source with Photoionization by Radiation of Laser Plasma // Technical Physics. Springer, 2020. Vol. 65, № 12. P. 1905–1911.

5. **Bukharina A.,** Pento, A., Simanovsky Y., Nikiforov S. Mass spectrometry of volatile organic compounds ionised by laser plasma radiation // Quantum Electronics 2021 Т. 51 №. 5 С. 393

6. Pento A., **Bukharina A.**, Nikiforov S., Simanovsky Y., Sartakov B., Ablizen R., Fabelinsky V., Smirnov V., Grechnikov A. Laser-induced plasma on a metal surface for ionization of organic compounds at atmospheric pressure // International Journal of Mass Spectrometry. Elsevier, 2021. Vol. 461. P. 116498.

7. Fabelinsky V., **Bukharina A.,** Pento V., Sartakov B., Ablizen R., Simanovsky Ya. Laser Plasma on Metal Target Surface as a Source of Vacuum UV Radiation for Ionizing Organic Molecules in Mass Spectroscopy // Phys. Wave Phen. 2021. Vol. 29, № 3. P. 210–220.

8. Kochevalina M.Yu., Bukharina A.B., Trunov V.G., Pento., A.V., Morozova O.V., Kogun' G.A., Simanovsky Ya.O., Nikiforov S.M., Rodionova E.I. Changes in the urine volatile metabolome throughout growth of transplanted hepatocarcinoma //Scientific Reports. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 1-10.

Список докладов на конференциях по теме диссертационной работы

1. **Айтуганова А.Б.** «Исследования масс-спектров молекул лидокаина и тофизопама SALDI-QTOF масс-спектрометром». 55 Всероссийская научная конференция МФТИ. 19-25 ноября 2012 г. Москва -Долгопрудный - Жуковский

2. Pento A., Nikiforov S., Moshkunov K., **Aytuganova A.**, Grechnicov A., Simanovsky Ya., Alimpiev S. Laser ablation and UV laser plasma ionization for direct analysis and MS imaging// Innovations in Mass Spectrometry Instrumental Conference. July, 14-18, 2013, Saint-Petersburg.

3. Пенто А., Алимпиев С., Никифоров С., Симановский Я., **Бухарина А.**, Аблизен Р. Лазерная абляция и ионизация ВУФ излучением лазерной плазмы в масс-спектрометрии органических объектов без предварительной подготовки// 14-ый международный междисциплинарный семинар «Математические модели и моделирование в лазерно-плазменных процессах и передовых научных технологиях», 4-9 июля 2016 г., г. Москва

4. **Bukharina A.**, Pento A., Nikiforov S., Alimpiev S., Simanovsky Ya., Grechnikov A. Laser mass spectrometry for biological tissue analysis and pathology identification// 2018 International Conference Laser Optics (ICLO), 4-8 June 2018, Saint-Petersburg.

5. **Бухарина А.**, Пенто А., Аблизен Р., Гречников А., Никифоров С. Лазерная плазма в масс-спектрометрическом анализе органических объектов// Школа-конференция молодых ученых ИОФ РАН "Прохоровские недели", 11 - 23 октября 2018.

6. **Бухарина А.**, Пенто А., Аблизен Р., Никифоров С. Лазерная масс-спектрометрия биологических объектов для фармакологических и гистологических исследований// 61-я Всероссийская научная конференция МФТИ, 19–25 ноября 2018

7. **Бухарина А.**, Пенто А., Аблизен Р., Сидоров А., Кравец К. Ионизация излучением лазерной плазмы в масс-спектрометрическом анализе биологических объектов при атмосферном давлении. VIII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ 2019

8. Сидоров А., **Бухарина А.**, Пенто А. Масс-спектрометрический анализ спиртов с ионизацией излучением лазерной плазмы при атмосферном давлении в газах// V Международная конференция «Лазерные, плазменные исследования и технологии» ЛаПлаз-2019

9. Козловский В., Филатов В., Никифоров С., Сартаков Б., Пенто А., **Бухарина А.**, Сулименков И., Брусов В., Фабелинский В., Симановский Я. ИОНИЗАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ИОНАМИ МЕТАЛЛА ИЗ ЛАЗЕРНОЙ ПЛАЗМЫ// XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (9-13 сентября 2019 г.)

10. Кравец К., **Бухарина А.**, Лаптинская П., Гречников А. Ионизация органических соединений излучением лазерной плазмы в сочетании с масс-анализатором ORBITRAP// XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, 9- 13 сентября 2019 г., г. Санкт-Петербург

11. Kochevalina M., Rodionova E., Morozova O., Nikiforov S., Pento A., **Bukharina A**. Influence of model hepatocarcinoma development time on sick animals' detection by dogs and laser mass spectrometer // ECRO 2019, Trieste–Italy. 11. - 14. September 2019

12. **Бухарина А.**, Кочевалина М., Пенто А., Родионова Е. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений урины животных для диагностики патологических процессов// VIII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». Москва, 14–18 октября 2019 года.

13. **Бухарина А**., Пенто А., Аблизен Р. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений для применения в постгеномной медицине// Школа-конференция молодых ученых ИОФ РАН «Прохоровские недели». Москва, 29-31 октября 2019 г.

14. Пенто А., **Бухарина А.**, Козловский В., Чудинов А., Филатов В., Фабелинский В., Симановский Я., Сартаков Б., Никифоров С. Механизмы ионизации органических соединений излучением лазерной плазмы при различных давлениях// VIII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». Москва, 14–18 октября 2019 года.

15. **Бухарина А.**, Пенто А., Аблизен Р., Фабелинский В., Симановский Я., Сартаков Б., Гречников А., Никифоров С. Ионизация излучением лазерной плазмы для масс-спектрометрии биологических объектов при атмосферном давлении// VIII Всероссийская конференция с международным участием «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы». Москва, 14–18 октября 2019 года.

16. Аблизен Р., Пенто А., **Бухарина А.** Математическое моделирование динамики ионов в атмосферном ионном источнике с импульсной фотоионизацией излучением лазерной плазмы// Школа-конференция молодых ученых ИОФ РАН «Прохоровские недели». Москва, 29-31 октября 2019 г.

17. Ракоца О., Яковлев В., **Бухарина А.**, Пенто А. Анализ спектров летучих органических соединений и биомаркеров повреждения почек в моче у детей с пузырно-мочеточниковым рефлюксом// XIV Ежегодная научно-практическая конференция «Совершенствование педиатрической практики. От простого к сложному». Москва, 28 ноября 2019, г.

18. Сидоров А., **Бухарина А.**, Пенто А., Аблизен Р., Никифоров С., Кравец К. Сравнение эффективности ионизации излучением лазерной плазмы и химической ионизации в масс-

спектрометрии органических соединений// IX МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФОТОНИКЕ И ИНФОРМАЦИОННОЙ ОПТИКЕ, 2020

19. **Bukharina A.**, Kochevalina M., Pento A., Simanovsky Ya., Rodionova E., Nikiforov S. Laser mass spectrometry of volatile organic compounds for diagnosis of pathological processes// 19th International Conference Laser Optics (ICLO 2020), Saint-Petersburg.

20. Iakovlev V., Rakotsa O., Fedulkina A., Pento A., **Bukharina A.**, Morozova O. A complex analysis of urine volatile organic compounds and kidney injury biomarkers in children with congenital uropathies// 6-7.01.2020 The 2nd UK Russia Young Medics Conference, Cambridge, 2020

21. **Бухарина А.**, Пенто А. Ионизация летучих органических соединений излучением лазерной плазмы// 63 Конференция МФТИ. 2020

22. **Бухарина А.**, Пенто А. Пределы обнаружения метода лазерной масс-спектрометрии APLPI// Школа-конференция молодых учёных «Прохоровские недели» 2020

23. Васалатий И., Негматова К., **Бухарина А.**, Пенто А., Яковлев В. Изменения метаболома и протеома мочи у детей с врожденными уропатиями// Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2021»

24. **Бухарина А.,** Яковлев В., Пенто А. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений мочи детей с врождёнными уропатиями// Школа-конференция молодых учёных «Прохоровские недели», 2021

25. **Бухарина А.**, Пенто А., Яковлев В., Морозова О., Никифоров С. Лазерная масс-спектрометрия летучих органических соединений мочи детей для поиска заболеваний почек// Десятый съезд ВМСО IX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 18–22 октября 2021 года г. Москва

26. Пенто А., **Бухарина А.**, Никифоров С., Симановский Я. Ионизация органических соединений излучением лазерной плазмы в газах при атмосферном давлении// Десятый съезд ВМСО IX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 18–22 октября 2021 года г. Москва

27. Филатов В., Брусов В., Пихтелев А., Сулименков И., Крушинская И., Болтнев Р., Никифоров С., **Бухарина А.**, Пенто А., Козловский В. Исследование ионизации органических соединений ионами Cu+ из лазерной плазмы в интерфейсе Орто-ВПМС при давлениях буферного газа 0.01-5 Торр// Десятый съезд ВМСО IX ВСЕРОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы» 18–22 октября 2021 года г. Москва

Благодарности

В заключение я хотела бы выразить искреннюю благодарность моему научному руководителю к.ф.-м.н. Сергею Михайловичу Никифорову за помощь на всех этапах работы над диссертацией, внимание, терпение и доброе отношение ко мне. Выражаю глубокую признательность директору Института Общей Физики РАН члену корреспонденту РАН д.ф.-м.н. Сергею Владимировичу Гарнову за всестороннюю поддержку. Выражаю искреннюю благодарность дружному коллективу отдела колебаний, лаборатории лазерной диагностики за теплое отношение, своевременную техническую помощь, всестороннюю поддержку, особенно к.т.н. Ярославу Олеговичу Симановскому и к.ф.-м.н. Андрею Владимировичу Пенто за помощь в проведении экспериментов, к.ф.-м.н. Борису Григорьевичу Сартакову за ценные консультации. Благодарю коллектив Отдела оптической спектроскопии, особенно д.ф.-м.н. профессора Валерия Васильевича Смирнова и к.ф.-м.н. Виктора Иммануиловича Фабелинского за помощь в проведении экспериментов и интерпретацию результатов. Благодарю коллектив лаборатории Фотоника: Квантовые Материалы и Технологии за обсуждение результатов и полезные комментарии. Выражаю искреннюю благодарность к.ф.-м.н. Алексею Викторовичу Богачу за всестороннюю поддержку.

Выражаю благодарность за сотрудничество коллегам из Института геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук, д.х.н. Александру Анатольевичу Гречникову и сотрудникам его лаборатории.

Также выражаю благодарность за плодотворное сотрудничество коллегам из Филиала Федерального Исследовательского Центра Химической Физики имени Н.Н. Семёнова заведующему лаборатории Масс-спектрометрии в экологии и энергетике к.ф.-м.н. Вячеславу Ивановичу Козловскому и к.ф.-м.н. Василию Викторовичу Филатову.

Благодарю за сотрудничество и интересную работу коллег из Института Проблем Передачи Информации к.б.н. Елену Ивановну Родионову и Марину Юрьевну Кочевалину.

Выражаю благодарность к.ф.-м.н. Михаилу Андреевичу и Михаилу Михайловичу Бухариным, благодаря которым процесс написания диссертации был равномерно растянут на пять лет.