

Uniwersytet Warszawski
Wydział Fizyki

Mateusz Winkowski

**Wykrywanie śladowych ilości
formaldehydu i etanu w powietrzu
metodami spektroskopii laserowej**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Tadeusz Stacewicz
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, 2023

Spis treści

Indeks oznaczeń	4
Wstęp	5
Część I - wprowadzająca.....	6
1.1. Wykrywanie śladowych ilości gazów	7
1.2. Biomarkery w powietrzu wydychanym z płuc	7
1.3. Konwencjonalne metody pomiarowe.....	8
1.4. Metody optyczne – Absorpcyjna spektroskopia laserowa	9
1.5. Ultraczułe metody absorpcyjnej spektroskopii laserowej	10
1.5.1. Spektroskopia z modulacją długości fali	11
1.5.2. Spektroskopia wieloprześciowa	12
1.5.3. Spektroskopia strat we wnęce optycznej	13
1.5.4. Spektroskopia fotoakustyczna.....	14
1.5.5. Spektroskopia fotoakustyczna QEPAS	15
1.5.6. Inne metody optyczne	16
1.6. Widma absorpcyjne biomarkerów	17
1.7. Widma absorpcyjne biomarkerów	20
1.7.1. Baza widm gazów w podczerwieni.....	20
1.7.2. Analiza widma formaldehydu	21
1.7.3. Analiza widma etanu.....	21
1.7.4. Analiza widm innych związków występujących w oddechu w dużym stężeniu.....	21
1.8. Wyznaczenie optymalnych długości fali do detekcji biomarkerów	23
1.8.1. Porównanie rzeczywistych widm biomarkerów z symulacją	23
1.8.2. Program do analizy widm biomarkerów i interferentów	25
Część II - doświadczalna.....	31
2.1. Wybór odpowiedniej ultraczułej metody do planowanych zastosowań	32
2.1.1. Projekt komórki wieloprześciowej	32
2.1.2. Zakłócenia optyczne w systemach z komórkami wieloprześciowymi	36
2.1.3. Redukcja szumów optycznych poprzez modulację długości fali.....	39
2.2. Metodyka pomiaru – ogólna	43
2.3. Detekcja formaldehydu	43
2.3.1. Zastosowania wykrywania śladowych ilości formaldehydu.....	43
2.3.2. Przegląd osiągnięć w optycznym wykrywaniu śladowych ilości formaldehydu	45

2.3.3. Wybór optymalnej linii absorpcyjnej do wykrywania formaldehydu	45
2.3.4. Układ pomiarowy	46
2.3.5. Układ próżniowy.....	48
2.3.6. Redukcja szumów optycznych – eksperyment	49
2.3.7. Polimeryzacja i depolimeryzacja formaldehydu w aparaturze badawczej	52
2.3.8. Wyniki pomiarów	54
2.4. Detekcja etanu.....	56
2.4.1. Przegląd osiągnięć w wykrywaniu śladowych ilości etanu	56
2.4.2. Wybór optymalnej linii absorpcyjnej do wykrywania śladowych ilości etanu.....	56
2.4.3. Modulacja długości fali i wybór harmonicznej	57
2.4.4. Układ pomiarowy	59
2.4.5. Wyniki pomiarów	61
2.4.6. Detekcja kilku gazów przy pomocy jednego lasera.....	62
Podsumowanie	66
Dodatek: Prototypy sensorów formaldehydu i etanu do celów medycznych	69
3.1. Układ pomiarowy	70
3.2. Układ próżniowy.....	70
3.3. Procedura badawcza	71
Bibliografia	73

Podziękowania

Autor niniejszej pracy dziękuje prof. dr hab. Tadeuszowi Stacewiczowi za cierpliwość, wsparcie i pomoc podczas pracy nad rozprawą doktorską.

Serdeczne podziękowania należą się również Wojskowej Akademii Technicznej, we współpracy z którą dokonano pomiarów widm formaldehydu i etanu w podczerwieni.

Indeks oznaczeń

c – prędkość światła w próżni $\approx 3 \cdot 10^8$ m/s

d – grubość elementu optycznego

f – częstotliwość modulacji

F – ogniskowa zwierciadła

h – stała Plancka $\approx 6,63 \text{ J}\cdot\text{s} \cdot 10^{-34}$

$\hbar$ – zredukowana stała Plancka $\approx 1,05 \text{ J}\cdot\text{s} \cdot 10^{-34}$

I – natężenie światła wiązki lasera po przejściu przez absorber

I_0 – natężenia promieniowania przed absorberem

J – rotacyjna liczba kwantowa

L – długość drogi światła

N – stężenie cząsteczek absorbujących światło

n – współczynnik załamania światła

p – ciśnienie

Q – dobroć rezonansu (finesse)

R – współczynnik odbicia zwierciadła

sep – odległość między zwierciadłami w komórce wieloprzejściowej

t – czas

T – transmisja elementu lub układu optycznego

T_p – temperatura

V – oscylacyjna liczba kwantowa

α – współczynnik absorpcji

γ – grubość optyczna: $\gamma = \alpha L$

$\Delta\varepsilon$ – rozmycie poziomu energetycznego molekuly

λ – długość fali światła

λ_L – długość fali światła lasera

ν – częstość fali elektromagnetycznej (fotonu)

σ – przekrój czynny na absorpcję

τ – czas życia molekuly w określonym stanie kwantowym

τ_0 – czas zaniku światła w rezonatorze optycznym niewypełnionym absorberem

τ_A – czas zaniku światła w rezonatorze optycznym zawierającym absorber

Wstęp

Tematem przewodnim niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wykrywalności dwóch markerów chorobowych - formaldehydu i etanu, w powietrzu bezpośrednio wydychanym z płuc za pomocą metod optycznych. Osiągnięcie zadowalających rezultatów wiązało się z możliwością konstrukcji urządzenia umożliwiającego wykrywanie powiązanych z tymi związkami schorzeń (w tym nowotworowych) na wczesnym etapie oraz pozwalającego na badania przesiewowe.

Część pierwsza dotyczy wykrywania śladowych ilości gazów. Traktuje ona o markerach chorobowych w wydychanym powietrzu z naciskiem na formaldehyd i etan, których detekcja stanowi zasadniczą część niniejszej pracy. Omówione są konwencjonalne oraz optyczne metody pomiaru biomarkerów. W szczególności skupiono się na metodach wykorzystujących absorpcyjną spektroskopię laserową. Przedstawiono techniki charakteryzujące się zwiększoną czułością, gdyż umożliwiają one wykrywanie gazów w ilościach rzędu pojedynczych cząstek na miliard. Skupiono się również na omówieniu widm cząsteczek w podczerwieni. Zaprezentowano wyniki szczegółowej analizy – z wykorzystaniem bazy danych HITRAN – widm absorpcji światła przez etan i formaldehyd pod kątem ich detekcji w oddechu. Uwzględniono zakłócenia wywołane przez inne związki występujące w ludzkim oddechu oraz wpływ ciśnienia w próbce na kształt widm.

Część druga zawiera rozdziały doświadczalne. Biorąc pod uwagę, że planowane urządzenie do badania ludzkiego oddechu powinno być przenośne zdecydowano się na wykorzystanie laserowej spektroskopii wieloprzełściowej. Zapewnia ona wysoką stabilność i odporność na zewnętrzne zakłócenia, a więc przydatność także poza laboratorium optycznym. Użyto samodzielnie zaprojektowanej komórki wieloprzełściowej. W ramach pracy doktorskiej, przy współpracy z Antonim Beliną-Brzozowskim (praca licencjacka pod kierunkiem prof. Tadeusza Stacewicza), powstało oprogramowanie służące do symulacji i optymalizacji takiej konstrukcji. W dalszej części rozdziału drugiego dokonano analizy powstawania zakłóceń optycznych i przedstawiono autorską metodę ich tłumienia. W następnych podrozdziałach opisano aparaturę doświadczalną oraz metodykę pomiarową. Omówiono układy do detekcji formaldehydu oraz etanu, wraz z ich szczegółowymi cechami wynikającymi ze specyfikacji badanych gazów. Na koniec opisano eksperyment mający na celu detekcję kilku gazów za pomocą jednego źródła światła podczerwonego.

Dodatek omawia konstrukcję urządzenia przeznaczonego do testów klinicznych. Zbudowane zostały dwa prototypowe układy do pomiaru formaldehydu i etanu. Ich konstrukcja i oprogramowanie zostały opracowane pod kątem możliwości obsługi przez personel medyczny.

Część I - wprowadzająca

1.1. Wykrywanie śladowych ilości gazów

Szybka i precyzyjna detekcja śladowych ilości gazów jest szeroko wykorzystywana – wymienić tu można m.in. rolnictwo i hodowlę zwierząt, monitorowanie i ochronę środowiska albo wykrywanie substancji toksycznych. Ma też istotne znaczenie w medycynie [1 2]. Badając liczne związki występujące w powietrzu wydychanym z płuc w śladowych ilościach możliwe jest uzyskanie informacji o indywidualnych cechach i kondycji organizmu oraz o stanie zdrowia pacjenta [3 4 5]. Występowanie w nadmiernej ilości niektórych z tych związków (zwanych biomarkerami) może mieć związek z procesami chorobowymi. Badanie powietrza wydychanego z płuc człowieka może więc służyć jako narzędzie do identyfikacji różnych chorób na wczesnym etapie ich rozwoju. Z tego powodu pożądane jest poszukiwanie nowych - szybkich, tanich, prostych w obsłudze i bezinwazyjnych - metod oznaczania biomarkerów [6, 7].

1.2. Biomarkery w powietrzu wydychanym z płuc

W powietrzu wydychanym z płuc dominują gazy normalnie występujące w atmosferze, a więc przede wszystkim: azot i tlen, a także woda i dwutlenek węgla. W mniejszym stężeniu stwierdzono obecność ponad trzech tysięcy innych substancji, w tym biomarkerów [8, 9]. Ich koncentracja zależy od indywidualnych cech danego organizmu, ale może też wskazywać na objaw konkretnej dolegliwości. Przykładem może być tlenek azotu, którego zawartość zależy od wieku, płci, pojemności płuc i pory dnia. U kobiet obserwuje się wpływ fazy cyklu miesięczkowego na stężenie tego gazu. Ponadto palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, oraz oddychanie zanieczyszczonym powietrzem również mogą oddziaływać na skład oddechu.

Część związków stanowią tzw. substancje endogenne, czyli powstające w sposób naturalny podczas rozmaitych procesów mających miejsce w organizmie człowieka. Na przykład: tlenek węgla pojawia się wskutek utleniania kwasów tłuszczowych, siarczek karbonylu wytwarzany jest przez bakterie jelitowe, węglowodory jako wynik metabolizmu i utleniania lipidów, metanol to produkt metabolizmu owoców, itp. Przykłady biomarkerów wraz z chorobami, które są przyczyną ich nadmiernego stężenia w oddechu ludzkim podano w tabeli 1.

Tabela 1: Biomarkery występujące w oddechu wraz z odpowiadającymi im chorobami

Tlenek azotu, etan, tlenek węgla	Astma [10, 11, 12]
Formaldehyd, i wyższe aldehydy	Nowotwór piersi [13]
Formaldehyd (w moczu)	Nowotwór prostaty [14]
Aceton	Cukrzyca [15]
Amoniak	Zakażenie <i>helicobacter pylori</i> [16]
Siarczek karbonylu	Schorzenia wątroby [17]
Cyjanowodór	Mukowiscydoza [18]

Należy zaznaczyć, że stężenia chorobowe biomarkerów w oddechu są bardzo małe, zwykle rzędu pojedynczych cząstek na miliard (np. 3,5 ppb dla etanu oraz 10 ppb dla formaldehydu).

1.3. Konwencjonalne metody pomiarowe

Badania powietrza wydychanego z płuc prowadzone są od kilkudziesięciu lat, przede wszystkim przy użyciu chromatografii gazowej [19]. Jest to najpowszechniejsza technika stosowana do detekcji biomarkerów. Polega ona na wprowadzeniu próbki badanego powietrza do kolumny chromatograficznej, w której przeprowadzany jest proces separacji fizykochemicznej. Próbkę jest transportowana wzdłuż kolumny za pomocą gazu obojętnego. Związki chemiczne o różnym powinowactwie do fazy stacjonarnej poruszają się z różnymi prędkościami. Dzięki temu następuje ich separacja. Na wyjściu kolumny stosuje się różne metody wykrywania cząsteczek. Należą do nich na przykład: wykrywanie płomieniowo-jonizacyjne (FID), spektrometria masowa (MS) i spektrometria ruchliwości jonów (IMS).

W detektorze FID substancje są wykrywane za pomocą pirolizy związków. FID charakteryzuje się wysoką czułością, szerokim zakresem liniowej pracy i niskim poziomem szumu. Granica wykrywalności sięga pojedynczych cząstek na miliard (ppb). Z tego powodu detektor FID jest bardzo często wykorzystywany w analizie oddechu. System płomieniowo-jonizacyjny został zastosowany m.in. do detekcji acetonu, pentanu, izoprenu, heksanal i innych lotnych związków organicznych, a także do obserwacji komórek raka płuc i kultur bakteryjnych [20,9].

Innym od chromatografii sposobem ilościowej analizy związków chemicznych jest spektroskopia masowa (MS). Zasada działania polega na określeniu stosunku masy do ładunku zjonizowanych atomów lub cząsteczek. Jej główną zaletą jest wysoka selektywność i czułość. Współcześnie używana jest spektrometria ruchliwości jonów, stanowiąca rozwinięcie tej techniki. Obecnie dostępne detektory IMS są kompaktowe, przenośne i dają możliwość prowadzenia kompleksowej analizy substancji chemicznych [21]. Wyodrębnioną metodą wykrywania biomarkerów jest spektrometria masowa reakcji transferu protonów (PTR-MS). Stosuje się tu jonizację chemiczną opartą na efekcie przejścia protonowego [22]. Spektrometria mas wybranych jonów z reakcyjną komorą przepływową (SIFT-MS) to kolejna dynamicznie rozwijająca się technika analizy oddechu. SIFT-MS może być skutecznie stosowana w diagnostyce klinicznej oraz monitorowaniu terapeutycznym [23].

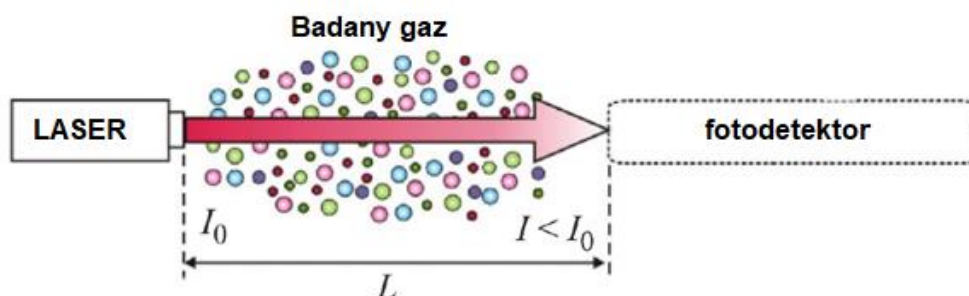
Czujniki elektroniczne to inna grupa analizatorów stosowanych do wykrywania biomarkerów w oddechu [24]. Istnieje wiele typów konstrukcji takich sensorów, na przykład masowy detektor fali akustycznej, czujnik powierzchniowej fali akustycznej, detektory z polimerami przewodzącymi [25] i inne [26]. Tak zwane elektroniczne nosy są ważnymi instrumentami we współczesnej diagnostyce klinicznej [27]. W szczególności intensywnie rozwijane są sensory półprzewodnikowe wykorzystujące tlenki metali jako materiał zmieniający swoje własności pod wpływem określonych związków chemicznych [28]. Detektory elektroniczne mogą być używane m.in. do wykrywania amoniaku, etanolu, wielu związków organicznych, a także tlenku węgla [29] oraz tlenku azotu [30]. Urządzenia te, dostępne na rynku w formie komercyjnej (produkowane m.in. przez firmy Siemens i Bosch),

są relatywnie tanie, łatwe w użyciu i umożliwiają wielokrotnie szybsze od chromatografów pomiary.

Mimo, że stosuje się wiele metod analizy oddechu, nadal widoczny jest brak odpowiedniej techniki dla pewnych biomarkerów (m.in. formaldehydu). Każda metoda ma swoje zalety i ograniczenia. Metody chromatograficzne nie mogą być stosowane do badań przesiewowych z szeroko dostępną diagnostyką ze względu na duży koszt sprzętu obsługiwanego przez wyspecjalizowany personel, skomplikowaną konserwację i długi (kilkudziesięciominutowy) czas pojedynczego badania. Nawet zastosowanie względnie szybkich czujników elektronicznych, które są najwygodniejsze do tego celu, napotyka na trudności ze względu na ich relatywnie niską czułość. W związku z tym ciągle poszukuje się nowych metod analizy oddechu, o czym świadczą m.in. próby wykorzystania psów do wykrywania markerów chorobowych [31].

1.4. Metody optyczne – Absorpcyjna spektroskopia laserowa

Do selektywnej detekcji związków chemicznych dobrze nadaje się spektroskopia absorpcyjna. Schemat najprostszego systemu do laserowej spektroskopii jednoprzęściowej i wykrywania związków gazowych zaprezentowano na rys. 1.



Rysunek 1: Uproszczony schemat jednoprzęściowej absorpcyjnej spektroskopii laserowej.

W technice tej wiązka światła o natężeniu I_0 i długości fali λ przechodzi przez próbkę badanego powietrza i jest w niej osłabiana wskutek pochłaniania promieniowania przez obecne w niej cząsteczki. Natężenie wyjściowe światła I jest zależne od współczynnika absorpcji gazu (α) na danej długości fali oraz długości drogi optycznej (L) światła w próbce. Zgodnie z prawem Bouguera-Lamberta-Beera [32]:

$$I(L, \lambda) = I_0(\lambda)e^{[-\alpha(\lambda)L]} \quad (1.4.1)$$

Jest ono zachowane jedynie w przypadku wiązki światła o spektralnej gęstości mocy na tyle niewielkiej, że nie powoduje ona optycznego nasycenia absorbującego ośrodka [33].

Współczynnik absorpcji jest liniowo zależny od stężenia absorbujących cząstek (N) oraz ich przekroju czynnego na absorpcję (σ):

$$\alpha = \sigma N \quad (1.4.2)$$

Im większy jest współczynnik α tym silniej światło jest absorbowane przez cząsteczki (a co za tym idzie – łatwiej je wykryć na drodze optycznej L). W związku z tym w celu osiągnięcia wysokiej czułości i selektywności światło powinno być dostrojone do linii absorpcji

poszukiwanej substancji charakteryzującej się dużym przekrojem czynnym. Dla śladowych ilości gazów $\alpha L < 0,001$, więc koncentrację cząsteczek można przybliżyć wzorem:

$$N = \frac{1}{\sigma L} \ln \frac{I_0}{I} \approx \frac{1}{\sigma L} \left(1 - \frac{I}{I_0}\right) \quad (1.4.3)$$

Omawiana metoda detekcji stosowana jest od kilkuset lat do identyfikacji różnych substancji, przede wszystkim w gazach i cieczach. Obecnie szeroka dostępność laserów pracujących w podczerwieni otwiera wiele nowych możliwości. Użycie stabilnego, wąskopasmowego (jednomodowego) światła laserowego, o dokładnie określonej długości fali w porównaniu z innymi źródłami, pozwala na precyzyjne dostrojenie go do wybranej linii absorpcyjnej poszukiwanej cząsteczki. Dzięki temu zwiększa się czułość detekcji – gdyż wykorzystuje się zakres spektralny, w którym przekrój czynny ma dużą wartość. Ponadto dzięki odpowiedniemu wyborowi długości fali poprawie ulega selektywność metody, gdyż zmniejsza się wpływ absorpcji spowodowanej przez inne związki obecne w gazie. Dodatkowo, łatwo można posłużyć się metodami poprawiającymi czułość detekcji, jak modulacja amplitudy, spektroskopia strat we wnętrzu czy spektroskopia wieloprzejsiowa, a w przypadku zastosowania lasera przestrajalnego - modulacja długości jego fali (opisane w dalszych rozdziałach pracy).

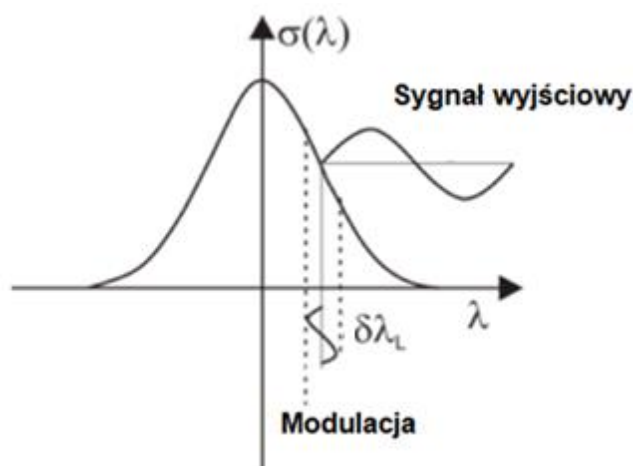
Typowe przekroje czynne na absorpcję w podczerwieni dla silnych przejść w molekułach wynoszą od około 10^{-20} do 10^{-18} cm^2 pod ciśnieniem atmosferycznym. Wykorzystując stałą Loschmidta ($2,68 \cdot 10^{19} \text{ cm}^{-3}$) można obliczyć, że dla stężenia absorbera rzędu jednej cząstki na milion (ppm) zgodnie ze wzorem 1.4.2 typowy współczynnik absorpcji osiąga wartość rzędu od 10^{-7} do 10^{-5} cm^{-1} . Zakładając w układzie doświadczalnym z rys. 1 drogę optyczną równą 1 m można oszacować (korzystając ze wzoru 1.4.3), że wystąpi osłabienie światła o czynnik rzędu 10^{-5} do 10^{-3} . Jest to wielkość trudna do zmierzenia. Prowadzi to do wniosku, że ze względu na niewielkie (w warunkach laboratoryjnych) rozmiary aparatury czułość spektroskopii jednoprzejsiowej nie jest wystarczająca do detekcji śladowych ilości gazów - w szczególności tych będących biomarkerami chorób, często o koncentracji rzędu pojedynczych ppb. Układy z drogą optyczną rzędu kilometrów stosowane w pomiarach atmosferycznych na otwartym powietrzu [34] nie mają tutaj zastosowania. W przypadku badań oddechu ograniczenie stanowi rozmiar docelowego urządzenia oraz objętość wydychanego powietrza (pojedyncze litry).

1.5. Ultraczułe metody absorpcyjnej spektroskopii laserowej

Biomarkery takie jak etan i formaldehyd (będące przedmiotem tej pracy) występujące w oddechu ludzkim w niewielkich koncentracjach (rzędu odpowiednio pojedynczych lub kilkunastu ppb) charakteryzują się niewielkimi współczynnikami absorpcji. Oznacza to, że do ich wykrywania metodami optycznymi należy posłużyć się metodami ultraczułymi.

1.5.1. Spektroskopia z modulacją długości fali

Jednym ze sposobów zwiększenia czułości pomiaru jest spektroskopia z modulacją długości fali (ang. *wavelength modulation spectroscopy*, WMS). Idea tej metody zaprezentowana została na rys. 2. Linia absorpcyjna jest na nim opisana przekrojem czynnym $\sigma(\lambda)$. Długość fali lasera λ jest modulowana z częstotliwością f w zakresie $\delta\lambda_L$. Ze względu na zależność σ od długości fali λ powoduje to amplitudową modulację wiązki przechodzącej przez badaną substancję ponieważ (zgodnie ze zmieniającą się długością fali lasera) światło jest raz mocniej, a raz słabiej pochłaniane przez badane cząsteczki. Modulacja sygnału wyjściowego jest tym większa im bardziej stroma jest funkcja przekroju czynnego.



Rysunek 2: Spektroskopia z modulacją długości fali – idea metody.

Detekcja składowej zmiennej zwiększa czułość układu pomiarowego i pozwala poprawić stosunek sygnału do szumu w stosunku do detekcji stałosygnałowej [35]. Również charakterystyka szumowa elementów elektronicznych używanych w torze pomiarowym (w tym wzmacniaczy operacyjnych) jest korzystniejsza przy pracy z sygnałem zmiennym, szczególnie w zakresie częstości modulacji rzędu $10^2 - 10^5$ Hz. Technika ta umożliwia¹ również stosowanie detekcji homodynowej (*lock-in*) [36].

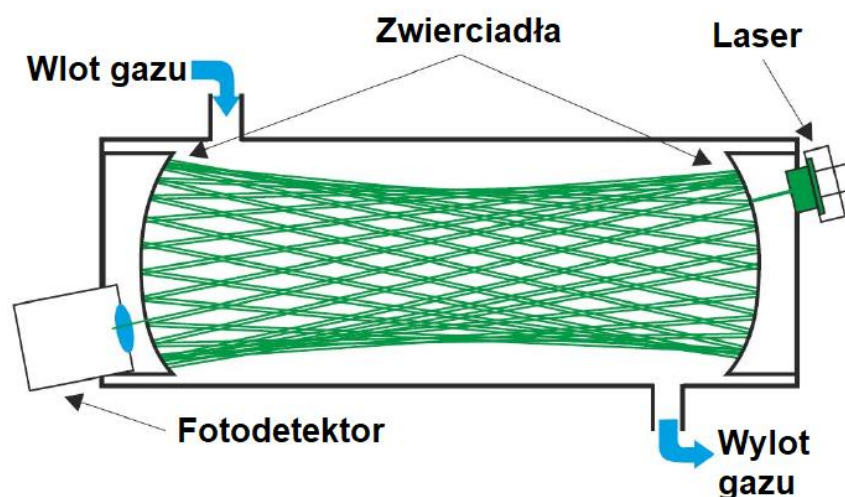
W zależności od tego, czy wykorzystywane jest rosnące czy opadające (jak na rysunku 2) zbocze linii absorpcyjnej, sygnał wyjściowy jest odpowiednio zgodny lub przesunięty w fazie o 180° względem sygnału modulacji. Szczególnym przypadkiem jest sytuacja, w której zmodulowana długość fali lasera jest zlokalizowana w pikie linii absorpcyjnej. Wtedy w sygnale wyjściowym dominuje druga harmoniczna i to na niej może być prowadzona detekcja. Szczegółowe rozważania na ten temat uwzględniające faktyczne parametry laserów stosowanych w eksperymencie opisane są w rozdziale 2.4.4.

¹ W niniejszej pracy technikę WMS zastosowano do detekcji etanu opisanej w rozdziale 2.4, gdzie przedstawiono też jej ścisłą analizę

1.5.2. Spektroskopia wieloprzejsciowa

Wieloprzejsciowa spektroskopia absorpcyjna (ang. *multipass spectroscopy*) wykorzystuje wydłużenie drogi optycznej w próbce. Zgodnie ze wzorami 1.4.1 - 1.4.3 powoduje to zwiększenie pochłaniania światła w gazie, co prowadzi do poprawy stosunku sygnału do szumu. W konsekwencji, wykorzystanie tej metody pozwala na wykrywanie badanego gazu z większą czułością. Szczególnie korzystne jest połączenie tej metody z techniką WMS opisaną w rozdziale 1.5.1.

W spektroskopii wieloprzejsciowej używane są specjalne komórki wyposażone w co najmniej dwa zwierciadła, które są precyzyjnie rozmieszczone względem siebie. Wiązka lasera wprowadzana jest do komórki przez mały otwór w jednym z lusterek. Następują jej odbicia między zwierciadłami, przez co światło przechodzi wielokrotnie przez badaną próbkę (rys. 3).



Rysunek 3: Spektroskopia wieloprzejsciowa – schemat ideowy.

Historycznie, pierwszymi tego typu konstrukcjami, powstałymi już kilkadziesiąt lat temu były: komórka Pfunda [37], komórka White'a [38] oraz komórka Herriota [39]. Pierwsza z nich pozwalała na trzykrotne wydłużenie drogi optycznej. Współczesne komórki wieloprzejsciowe pozwalają na jej kilkudziesięciokrotne lub nawet kilkusetkrotne zwiększenie [40]. Opracowano również okrągłe komórki charakteryzujące się małymi wymiarami przy zachowaniu zadowalającej drogi optycznej [41]. Istnieją także rozwiązania, w których zastosowano lustra astygmatyczne, pozwalające na zagęszczenie odbić, a w konsekwencji wydłużenie drogi optycznej przy zachowaniu kompaktowych rozmiarów [42]. Najnowsze doniesienia literaturowe informują również o komórkach z dużą liczbą odbić, ale zawierających prostsze w produkcji i tańsze lustra sferyczne, zaprojektowane przy użyciu algorytmów genetycznych [43]. Ze względu na szerokie użycie tego typu urządzeń w spektroskopii laserowej zarówno same komórki, jak i specjalne zwierciadła są dostępne komercyjnie [44].

Część komórek, dzięki specjalnej, szczelnej konstrukcji oraz wyposażeniu w odpowiednie przyłącza, umożliwia badanie gazu pod zmniejszonym ciśnieniem. Jego obniżenie pomaga w rozdzieleniu nakładających się widm różnych substancji dzięki

zmniejszeniu niekorzystnego zjawiska zderzeniowego poszerzenia linii spektralnych. Pozwala to na detekcję śladowych ilości interesujących substancji w obecności innych gazów (interferentów), a więc poprawia selektywność układów. Temat ten rozwinęto w rozdziale 1.6.

W komórkach wieloprześciowych należy unikać powstawania rezonansów optycznych wskutek nakładania się wiązek światła. Z tego powodu liczba przejść przez komórkę (a co za tym idzie długość drogi optycznej) jest ograniczona wielkością plamki lasera, która zwykle ma rozmiar rzędu milimetrów. Trzeba również zwrócić uwagę na fakt, że używając do jej uformowania kołowej przysłony o małej aperturze, w wyniku dyfrakcji światła pojawiają się krążki Airy. Położone blisko siebie plamki mogą częściowo przykrywać się, a przez to interferować powodując powstawanie dodatkowej, niepożądanej modulacji nakładającej się na widmo transmisji komórki. To występujące w spektroskopii wieloprześciowej niekorzystne zjawisko, jak również metodę jego redukcji opisano szerzej w rozdziale 2.1.2

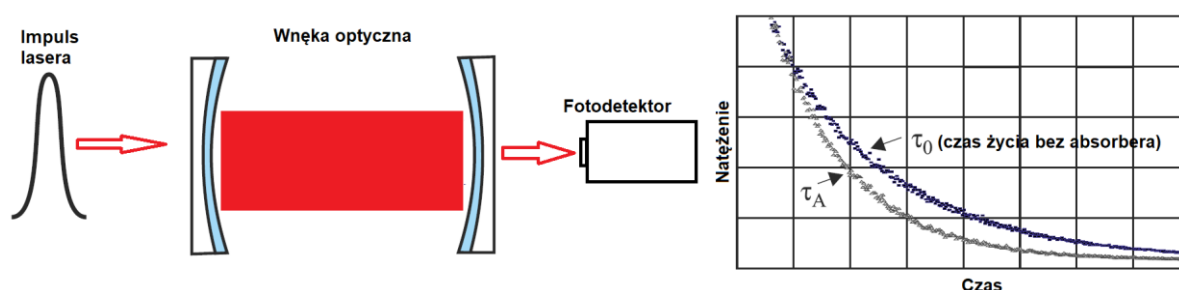
Wiele zespołów badawczych decyduje się na samodzielne wykonanie komórek wieloprześciowych. W trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej również zdecydowano się na własny projekt, opisany w rozdziale 2.1.1 Pozwoliło to na dopasowanie parametrów komórki do wymagań autora pracy.

1.5.3. Spektroskopia strat we wnęcie optycznej

Spektroskopia strat we wnęcie optycznej (ang. *cavity ring-down spectroscopy*, CRDS) jest jedną z najczulszych metod laserowej spektroskopii absorpcyjnej [45, 46]. Jej idea przedstawiona została na rys. 4. Impuls lasera wprowadzany jest do rezonatora optycznego. Wnęka zbudowana jest ze zwierciadeł charakteryzujących się bardzo wysokim współczynnikiem odbicia dla światła o danej długości fali. Impuls ulega uwięzieniu w rezonatorze, ale jego natężenie zanika wykładniczo wskutek strat we wnęcie. Czas zaniku promieniowania τ_0 w pustym (niewypełnionym absorberem) rezonatorze jest zależny od zastosowanych zwierciadeł zgodnie ze wzorem:

$$\tau_0 = \frac{L}{c(1-R)} \quad (1.5.3.1)$$

gdzie c jest prędkością światła, L długością komórki, a R - współczynnikiem odbicia luster.



Rysunek 4: Spektroskopia strat we wnęcie optycznej – idea pomiaru i obserwowane sygnały.

Po napełnieniu rezonatora absorbującym gazem czas zaniku promieniowania ze względu na zwiększenie strat wnęki jest krótszy i wyraża się wzorem:

$$\tau_A = \frac{L}{c((1-R)+\alpha L)} \quad (1.5.3.2)$$

– gdzie α oznacza współczynnik absorpcji badanego gazu, zgodnie ze wzorem 1.4.2. Mierzając zmianę natężenia światła w czasie i dopasowując do tych danych wykładniczy zanik można wyznaczyć τ_0 oraz τ_A i dalej, wykorzystując przekrój czynny na absorpcję, obliczyć koncentrację badanych cząsteczek za pomocą wzoru wynikającego z 1.5.3.1 i 1.5.3.2:

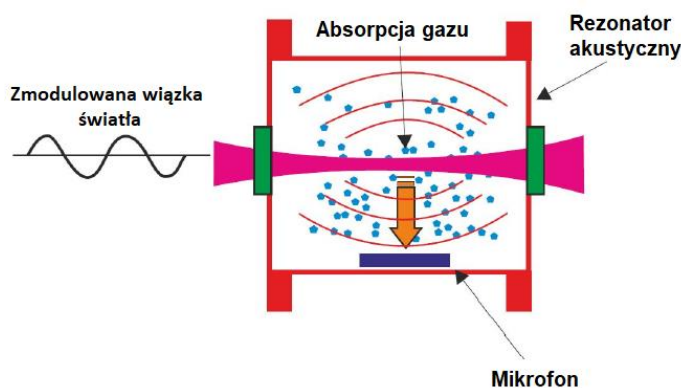
$$N = \frac{1}{c\sigma} \left(\frac{1}{\tau_0} - \frac{1}{\tau_A} \right) \quad (1.5.3.3)$$

Ze względu na długą efektywną drogę światła w rezonatorze (rzędu nawet kilometrów [47]) metoda ta jest wielokrotnie czulsza od opisanej w rozdziale 1.5.2 spektroskopii wieloprześciowej. Ma ona jednak dużo większe wymagania sprzętowe. Zwierciadła o wysokim współczynniku odbicia ($R \sim 1$) charakteryzują się zakresem pracy o szerokości zaledwie kilkudziesięciu nanometrów. Ponadto układ CRDS wymaga dużo większej stabilności mechanicznej niż komórka wieloprześciowa, co ogranicza jego mobilność.

Istnieje wiele modyfikacji techniki CRDS. Jedną z nich jest zastosowanie precyzyjnego lasera o pracy ciągłej wraz z modulatorem optycznym zamiast lasera impulsowego [48]. Dodatkowo, stosuje się elementy piezoelektryczne sprzężone z co najmniej jednym zwierciadłem w celu lepszego dostrojenia rezonatora optycznego do długości fali lasera [49]. Używane są również metody wykorzystujące detekcję różnicy przesunięcia fazowego sygnału z rezonatora spowodowanej uwiecznieniem promieniowania we wnętrzu przez gaz znajdujący się w jego wnętrzu [50], jak również metody polegające na badaniu szerokości modu węzki lub jej dyspersji w okolicach linii absorpcyjnej [51, 52, 53].

1.5.4. Spektroskopia fotoakustyczna

Spektroskopia fotoakustyczna (ang. *photoacoustic spectroscopy*) jest kolejną z metod o wysokiej czułości. Polega ona na wprowadzeniu do próbki amplitudowo zmodulowanej wiązki światła. Jego absorpcja przez cząsteczki powoduje okresowe nagrzewanie ośrodka. Zwiększa to cyklicznie jego ciśnienie, powodując w ten sposób generowanie fali dźwiękowej (rys. 5), która jest rejestrowana za pomocą mikrofonu [54].



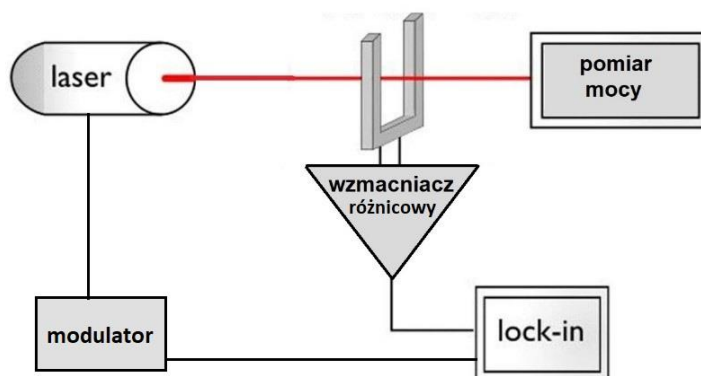
Rysunek 5: Spektroskopia fotoakustyczna.

Amplituda sygnału jest proporcjonalna do koncentracji badanego absorbera. W celu zwiększenia czułości stosuje się rezonatory akustyczne dostrojone do częstotliwości modulacji. W zależności od zastosowania mogą mieć one różne rozmiary i kształty [55, 56, 57, 58].

Niewątpliwą zaletą takiego podejścia jest fakt, że w przeciwieństwie do technik opisanych w rozdziałach 1.5.1 – 1.5.3 nie jest konieczne użycie jakichkolwiek czujników światła, które nie zawsze są dostępne dla interesującej długości fali. Do wad należy czułość na zakłócenia mechaniczne i dźwięki pochodzące z zewnątrz układu. Płaska i szeroka częstotliwościowa charakterystyka pracy typowego mikrofonu nie jest optymalna pod względem szumowym do zastosowań w fotoakustyce.

1.5.5. Spektroskopia fotoakustyczna QEPAS

W spektrometrze fotoakustycznym zastąpienie mikrofonu widelcem kwarcowym (np. identycznym jak stosowany w zegarku) prowadzi do dalszej poprawy czułości (*quartz enhanced photoacoustic spectroscopy* – QEPAS) [59]. Element ten, w porównaniu z konwencjonalnym mikrofonem, charakteryzuje się bardzo wysoką dobrocią rezonansu, sięgającą $7 \cdot 10^4$ – $1,1 \cdot 10^5$ w próżni i 10^4 – $1,3 \cdot 10^4$ pod ciśnieniem atmosferycznym [60]. Piezoelektryczny widelec kwarcowy wytwarza więc silny sygnał na swojej częstotliwości rezonansowej (ok. 32,7 kHz), ale jego czułość gwałtownie spada wraz z oddalaniem się od niej [61]. Taka charakterystyka jest korzystna w spektroskopii fotoakustycznej ze względu na zawężenie pasma pracy, a co za tym idzie skuteczniejszą eliminację szumów.



Rysunek 6: Spektroskopia QEPAS.

W układzie QEPAS zmodulowana amplitudowo wiązka lasera kierowana jest w szczelinę między widelkami kwarcu, co powoduje powstawanie asymetrycznych wibracji widelca (rys. 6). Z kolei fale dźwiękowe z innych, odległych źródeł poruszają widelkami rezonatora zgodnie, dając symetryczne sygnały na wejściach wzmacniacza [62]. W rezultacie, dzięki zastosowaniu w torze pomiarowym wzmacniacza różnicowego, można uzyskać dużą odporność na zakłócenia mechaniczne i dźwięki z otoczenia.

Topologia QEPAS posiada również inne zalety, takie jak m.in. niska cena. Zegarkowy widelec kwarcowy jest bardzo tani, a dodatkowo – z uwagi na fakt, że jest to metoda fotoakustyczna - nie jest wymagany fotodetektor. Ponadto, ze względu na bardzo

mały rozmiar piezoelementu (3,2 x 1 x 0,4 mm), czujnik ten nadaje się do badania niewielkich objętości gazów, rzędu centymetrów sześciennych.

Układy QEPAS zostały wykorzystywane w badaniu śladowych ilości gazów takich jak m.in. tlenek azotu [63], amoniak [64] i tlenek węgla [65]. Istnieje również wiele modyfikacji tej techniki poprawiających parametry. Zalicza się do nich m.in. stosowanie różnego rodzaju mikrorezonatorów [66, 67, 68], czy też kilku widelców kwarcowych [69], jak również kryształów kwarcu o częstotliwości rezonansowej mniejszej niż używana w zegarkach [70]. Dokonywano też prób połączenia techniki QEPAS z metodą wieloprzejściową [71] lub rezonatorem optycznym [72]. Postęp widoczny jest również w metodach analizy sygnału w układach QEPAS [73, 74].

Kluczowym elementem toru pomiarowego w QEPAS jest przedwzmacniacz współpracujący bezpośrednio z widelcem kwarcowym. Niestety, w przeważającej większości publikacji układ ten jest pomijany w szczegółowym opisie. Powszechnie stosuje się topologię transimpedancyjną, czyli przetwornik prąd-napięcie, typowo z rezystorem 10 MΩ [75, 76]. Autor niniejszej dysertacji opracował przedwzmacniacz wykorzystujący scalony wzmacniacz instrumentalny o sprzężeniu napięciowym. Pozwoliło to znacząco poprawić czułość oraz stosunek sygnału do szumu [77] w porównaniu z typowym układem transimpedancyjnym. Różnica wynosiła ok. 23 dB, co oznacza ponad dziesięciokrotny wzrost czułości pomiaru.

Niestety, próby wykorzystania techniki QEPAS w badaniach gazów określonych w temacie niniejszej pracy doktorskiej nie przyniosły zadowalających rezultatów. Czułość tej metody jest proporcjonalna do mocy używanego lasera. Lasery firmy Nanoplus, dopasowane do widm badanych substancji, charakteryzują się bardzo niewielką mocą wyjściową rzędu pojedynczych miliwatów. Technika ta nie była więc dalej rozwijana w ramach tej pracy doktorskiej.

1.5.6. Inne metody optyczne

Oprócz opisanych powyżej optycznych metod detekcji gazów o zwiększonej czułości istnieją również inne. Wykorzystuje się wydrążone światłowody transmitujące promieniowanie dostrojone do linii absorpcyjnych, a badany gaz wprowadzany jest do ich wnętrza [78]. Powoduje to zmniejszenie ich współczynnika transmisji. Istnieją również techniki używające światłowodów pozbawionych płaszcza, których współczynnik strat zależy od koncentracji absorbera w otaczającym je gazie [79].

Stosowane są również podejścia polegające na pomiarze zmiany współczynnika załamania światła w zależności od koncentracji absorbującego gazu. Metody tego typu, takie jak CLaDS (ang. *Chirped Laser Dispersion Spectroscopy*) [80] lub spektroskopia fototermiczna [81] nie wymagają (podobnie jak metody fotoakustyczne) użycia fotodetektora.

1.6. Widma absorpcyjne biomarkerów

Optyczna detekcja biomarkerów wymaga wykorzystania metod laserowej spektroskopii absorpcyjnej stanów oscylacyjno-rotacyjnych. Rozdział ten omawia podstawy fizyki molekularnej mające zastosowanie w użytych w tej pracy technikach pomiarowych.

Cząsteczka jest to neutralna elektrycznie grupa dwóch lub więcej atomów utrzymywanych razem za pomocą wiązania chemicznego. Może się ona składać z atomów jednego pierwiastka (jest wtedy nazywana homojądrową) lub z co najmniej dwóch różnych (heterojądrowa). Przykładem najprostszych molekuł są cząsteczki dwuatomowe, jak molekula wodoru (H_2), azotu (N_2) czy tlenu (O_2). Biomarkery – w szczególności formaldehyd (H_2CO) i etan (C_2H_6) zawierające więcej atomów należą do cząsteczek bardziej złożonych.

Energia wewnętrzna molekuł występuje w trzech postaciach. Różnią się one znacząco wartością. Energię rotacyjną można utożsamiać z ruchem obrotowym cząsteczki, traktowanej jako bryła sztywna. Wyraża się ona wzorem

$$E = BJ(J+1) \quad (1.6.1)$$

gdzie B oznacza stałą rotacyjną (wielkość charakterystyczna dla danej molekuly), a J – kwantową liczbę rotacji.

Energia oscylacyjna związana jest z drganiami względem siebie zrębów atomowych wchodzących w skład cząsteczki. Drgania te mają $3m - 6$ stopni swobody, gdzie m jest liczbą zrębów atomowych cząsteczce. Rozwiązanie równania Schrödingera dla harmonicznego oscylatora cząsteczkowego określa skwantowaną energię stanów oscylacyjnych jako

$$E = h\nu(V + \frac{1}{2}) \quad (1.6.2)$$

gdzie V jest kwantową liczbą oscylacji ($V = 0, 1, 2, \dots$), a h – stałą Plancka. Warto przy okazji zauważyć, że energia oscylacyjna (w przeciwieństwie do rotacyjnej) nigdy nie może osiągnąć wartości zerowej.

Energia elektronowa związana jest z energią kinetyczną elektronów poruszających się wokół jąder, jak również ich energią potencjalną wynikającą z przyciągania przez jądra i odpychania przez inne elektrony.

Molekuła może zwiększyć lub zmniejszyć swoją energię wskutek przejścia między stanami kwantowymi. Zmiana energii jest skokowa, o określonej porcję (kwant) wynikającą z różnicy energii stanu początkowego i końcowego. Niedopasowane energetycznie (a więc większe lub mniejsze) kwanty nie są pochłaniane ani emitowane. W przypadku przejść optycznych, pochłaniając (lub emitując) foton o wymienionej powyżej energii (a więc i długości fali) cząsteczka zmienia stan kwantowy przechodząc z danego poziomu energetycznego na inny. Zjawisko to jest podstawą spektroskopii [82].

Linie widmowe cząsteczek, odpowiadające przejściom między jej stanami, charakteryzują się pewną szerokością na skutek kilku zjawisk fizycznych. Pierwszym, zawsze występującym fenomenem jest naturalne rozmycie skwantowanych poziomów energetycznych, między którymi następuje absorpcja fotonu. Wynika ono wprost z zasady nieoznaczoności Heisenberga. Iloczyn czasu życia τ molekuly w danym stanie kwantowym

i rozmycia odpowiadającego mu poziomowi energetycznemu $\Delta\varepsilon$ jest zawsze większy od ściśle określonej wartości, zgodnie ze wzorem:

$$\Delta\varepsilon \tau \geq \hbar/2 \quad (1.6.3)$$

Kolejnym zjawiskiem wpływającym na kształt linii absorpcyjnych w gazach jest poszerzenie dopplerowskie, wynikające z tego, że cząsteczki oddziałujące z promieniowaniem poruszają się. W wyniku bezładnych, chaotycznych ruchów jedne molekuly zbliżają się do obserwatora, a inne oddalają, w związku z czym promieniowanie przez nie absorbowane (lub emitowane) ma zmienioną częstość, co prowadzi do poszerzenia widma. Profil natężeniowy linii widmowej poszerzonej dopplerowsko ma kształt gaussowski o szerokości zależnej od temperatury. Poszerzenie to stanowi jeden z głównych wkładów do szerokości linii widmowych w gazach pod niskim ciśnieniem.

Również oddziaływania cząsteczek z sąsiadami mogą zaburzać ich poziomy energetyczne. Zarówno zderzenia sprężyste, jak i niesprężyste wpływają na szerokość linii absorpcyjnych. Ponieważ szerokość linii w tym przypadku jest funkcją ciśnienia, wpływ zderzeń cząsteczek nazywany jest poszerzeniem zderzeniowym lub ciśnieniowym. Ponadto zderzenia mogą być również przyczyną przesunięcia linii. Profil absorpcji poszerzonej zderzeniowo jest opisywany funkcją Lorentza. Zjawisko to ma dominujący wkład do kształtu linii absorpcyjnych w warunkach zbliżonych do normalnych.

Kształt linii widmowej poszerzonej wskutek efektu Dopplera i zderzeń między cząsteczkami z dobrym przybliżeniem opisywany jest splotem profilu lorentzowskiego i gaussowskiego zwanym profilem Voigta [83].

Omówione powyżej podstawowe mechanizmy prowadzące do poszerzenia linii mają bardzo istotne znaczenie dla określania wartości przekrojów czynnych w eksperymentach opisywanych w części doświadczalnej. Wpływ tych zjawisk został uwzględniony w symulacjach, które opisano w rozdziale 1.7.

Poziomy energii związane z odmiennymi stanami cząsteczki (rotacyjnymi, oscylacyjnymi, elektronowymi) istotnie różnią się. Widma rotacyjne (związane ze zmianą ruchu obrotowego cząsteczek w wyniku pochłonięcia fotonu) mieszczą się w zakresie mikrofali, są to zatem fale centymetrowe o niewielkiej energii.

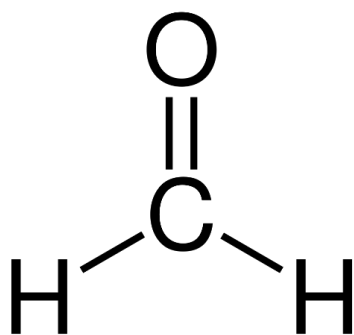
Widma oscylacyjne wiążą się ze zmianą stanu drgań (oscylacji) cząsteczek, mogą zawierać również zmiany jej stanu rotacyjnego (nazywane są wtedy oscylacyjno-rotacyjnymi). Mieszczą się one w zakresie światła podczerwonego (fale mikrometrowe). W przybliżeniu kwantowego oscylatora harmonicznego reguła wyboru (dopuszczająca poszczególne przejścia między poziomami) jest ograniczona do $\Delta V = \pm 1$. W rzeczywistości cząsteczka jest oscylatorem anharmonicznym, a więc dopuszczalne są (choć mniej prawdopodobne, a co za tym idzie słabsze) również większe zmiany liczby V , czyli przejścia $\Delta V = \pm 2, \pm 3, \dots$. Noszą one nazwę nadtonów (przejście z $\Delta V = \pm 1$ nazywane jest tonem podstawowym). Przejścia z poziomów innych niż $V = 0$ są dozwolone, ale w warunkach normalnych wartość średniej energii cząsteczek jest znacznie mniejsza od przerw energetycznych pomiędzy poziomami oscylacyjnymi. W związku z tym obsadzenie poziomu wyższego niż zerowy jest (w przeciwieństwie do poziomów rotacyjnych) niewielkie.

Widma elektronowe wiążą się ze zmianą stanu elektronów w cząsteczce (mogą zawierać również zmiany energii oscylacji i rotacji). Charakteryzują się największą energią i mieszczą się w zakresie światła widzialnego i ultrafioletu.

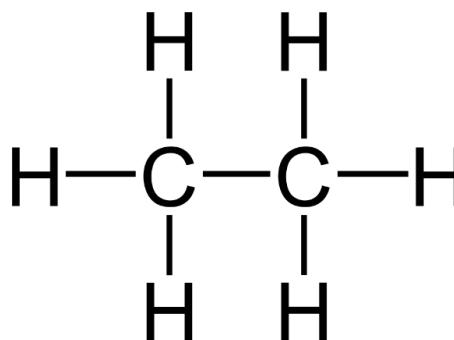
W tej pracy, omawiającej problem detekcji śladowych ilości gazów w podczerwieni, skupiono się na oscylacyjno-rotacyjnych widmach molekuł. Zdecydowano się na to z uwagi na fakt, że zakres długości fali widm rotacyjnych (daleka podczerwień) jest eksperymentalnie niewygodny. Z kolei widma elektronowe gazów w powietrzu nakładają się na siebie uniemożliwiając ich rozdzielenie i skuteczne wykrywanie. Jak napisano w poprzednich akapitach – gazy występujące naturalnie w powietrzu w znaczącej ilości (cząsteczki tlenu i azotu) nie posiadają widma rotacyjnego i oscylacyjnego, ale mają widmo elektronowe, które może stanowić przeszkodę w detekcji innych substancji interferując z ich liniami absorpcyjnymi. Ponadto, dostępność precyzyjnych laserów półprzewodnikowych jest największa w zakresie bliskiej i średniej podczerwieni.

Prawdopodobieństwo przejścia oscylacyjnego nie zależy – jak w przypadku przejścia rotacyjnego – od trwałego momentu dipolowego cząsteczki, tj. nie musi ona go posiadać (choć może). Warunkiem koniecznym jest natomiast aby podczas przejść oscylacyjnych jej moment dipolowy ulegał zmianie. Intensywność absorpcji jest tym większa im bardziej zmienia się on podczas danego drgania. Stąd brak jest widm oscylacyjnych dwuatomowych cząsteczek homojądrowych takich jak N_2 oraz O_2 . Z punktu widzenia niniejszej pracy jest to korzystne, ponieważ cząsteczki te, mimo że stanowią znaczącą większość powietrza wydychanego z płuc, nie zakłócają pomiaru.

a)



b)



Rysunek 7: Budowa cząsteczki formaldehydu (a) i etanu (b).

W wyniku empirycznych obserwacji zauważono, że cząsteczki zawierające konkretne grupy atomów charakteryzują się silnymi liniami oscylacyjno-rotacyjnymi o zbliżonej długości fali, która z reguły jest słabo zależna od budowy reszty cząsteczki. Zjawisko to jest widoczne zwłaszcza wtedy, gdy atomy grupy funkcyjnej łączące ją z pozostałą częścią molekuly są znacznie cięższe od pozostałych atomów tej grupy (m.in. - CH_3 , - OH , - NH_2). Grupy oscylują jako całość. Jak widać na rys. 7, zawarte są one także w cząsteczkach formaldehydu (CH_2O) oraz etanu (C_2H_6).

Cząsteczka formaldehydu posiada grupę karbonylową $C=O$ oraz dwie grupy $C-H$. Molekulę etanu z kolei stanowią dwie grupy metylowe (CH_3) połączone pojedynczym wiązaniem chemicznym. Oznacza to, że w jej skład wchodzi sześć grup $C-H$. Tabela 2 przedstawia charakterystyczne długości fali opisanych drgań w nanometrach.

Tabela 2: Charakterystyczne długości fali przejść oscylacyjnych grup chemicznych wchodzących w skład formaldehydu i etanu.

Grupa funkcyjna	Długość fali
$C=O$	5405 – 6079 nm
$C-H$	3226 – 3508 nm
$C-C$	8000 – 14285 nm

Warto mieć na uwadze, że w molekułach wieloatomowych mogą następować jednoczesne przejścia pomiędzy poziomami dwóch lub więcej oscylatorów. Noszą one nazwę tonów złożonych. Dodatkowo, w przypadku gdy ton jednego drgania ma częstotliwość zbliżoną do nadtonu innego (lub do tonu złożonego) może wystąpić rezonans Fermiego, przejawiający się pojawieniem w widmie dwóch drgań o różnej częstotliwości zamiast jednego [84]. Powoduje to komplikacje widma. W praktyce więc najczęściej korzysta się z gotowych bibliotek widm cząsteczek w podczerwieni bez wnikania w szczegółową analizę poszczególnych linii widmowych, która w przypadku molekuł zbudowanych z więcej niż dwóch atomów potrafi być bardzo złożona.

1.7. Widma absorpcyjne biomarkerów

Ze względu na konieczność wyboru odpowiedniej linii absorpcyjnej do opisywanych eksperymentów, kluczowe było dokładne przeanalizowanie widm interesujących gazów w zakresie podczerwieni. Istotny był nie tylko przekrój czynny linii absorpcyjnych (im większy tym większa czułość detekcji, zgodnie ze wzorem 1.4.1), ale także – a może przede wszystkim – należało znaleźć taką linię, która nie będzie zakłócona przez widma innych związków. Cząsteczki te, zwane dalej interferentami, powszechnie występują w ludzkim oddechu (niektóre w znaczącej ilości).

1.7.1. Baza widm gazów w podczerwieni

Jako biblioteka widm gazów posłużyła baza HITRAN (ang. *high-resolution transmission absorption database*) [85]. Zawiera ona zbiór parametrów wykorzystywanych w odpowiednich programach komputerowych do obliczania widm transmisji światła w atmosferze w różnych warunkach. Baza danych jest projektem zapoczątkowanym przez *Air Force Cambridge Research Laboratories* (AFCRL) pod koniec lat 60. w odpowiedzi na potrzebę szczegółowej wiedzy na temat właściwości atmosfery w podczerwieni [86]. Dostęp do danych jest bezpłatny po zarejestrowaniu się. Dodatkowo, na rynku istnieje również komercyjna aplikacja HITRAN-PC ułatwiająca symulacje. Ponadto, bezpłatnie

udostępniana jest biblioteka HAPI (*HITRAN Application Programming Interface*) w języku programowania *Python* [87]. Pozwala ona na przeprowadzenie symulacji wykorzystując aktualizowaną na bieżąco bazę danych HITRAN. Podczas przygotowywania pracy doktorskiej korzystano z obu powyższych rozwiązań.

Parametry możliwe do skonfigurowania obejmują m.in.:

- wybór absorbującego związku chemicznego;
- zakres widmowy symulacji;
- rodzaje domieszek oraz ich stężenia;
- rozdzielczość spektralną analizy;
- profil linii absorpcyjnych;
- temperaturę;
- ciśnienie;
- długość drogi optycznej światła.

1.7.2. Analiza widma formaldehydu

W widmie formaldehydu w podczerwieni występują dwa pasma o silnej absorpcji: w zakresie długości fali 5,7 μm oraz 3,5 μm [88]. Pierwsze z nich odpowiada oscylacjom ν_2 rozciągającym grupę funkcyjną C=O. Absorpcji w okolicach tej długości fali należy spodziewać się w aldehydach, a jej występowanie jest zgodne z tabelą 2 zamieszczoną w rozdziale 1.6. Drugi obszar, o wyższej energii, jest dość skomplikowaną kombinacją sześciu różnych pasm [89, 90], ich tonów złożonych oraz nadtonów. Na widmo to, leżące w okolicach 3,5 μm , składają się pasma $2\nu_4$, $\nu_4+\nu_6$, $2\nu_6$, $\nu_3+\nu_4$, $\nu_3+\nu_6$, ν_1 , ν_5 , $\nu_2+\nu_4$, $2\nu_3$, $\nu_2+\nu_6$, i $\nu_2+\nu_3$. Przede wszystkim są to tony podstawowe ν_1 i ν_5 , stanowiące symetryczne i antysymetryczne drgania grup C–H.

1.7.3. Analiza widma etanu

Opierając się na rozważaniach opisanych w rozdziale 1.6, w etanie – podobnie jak w wielu innych węglowodorach – należy spodziewać się silnego widma oscylacyjno-rotacyjnego w okolicach 3,2 - 3,5 μm z uwagi na obecność grup C–H. Cząsteczka ta posiada 12 drgań podstawowych związanych z rozciąganiem wiązań C–H i C–C (ν_1 , ν_3 , ν_5 , ν_7 i ν_{10}), deformacją grup metylowych (ν_2 , ν_6 , ν_8 , ν_{11}), skręcaniem cząsteczki (ν_4) oraz jej zginaniem (ν_9 , ν_{12}) [91, 92]. Największy wkład ilościowy w widmo wnoszą drgania ν_7 oraz ν_5 w okolicach długości fali odpowiednio 3,35 oraz 3,45 μm . Dodatkowo, na absorpcję wpływ mają nadtony i tony złożone innych oscylacji będące w rezonansie Fermiego z drganiem ν_7 [93].

1.7.4. Analiza widm innych związków występujących w oddechu w dużym stężeniu

W ludzkim oddechu, jak wspomniano w rozdziale 1.2, może znajdować się nawet 3000 różnych substancji. Ich widma mogą nakładać się na widma interesujących biomarkerów utrudniając, lub wręcz uniemożliwiając ich pomiar. Substancje (z pominięciem cząsteczek azotu i tlenu, które nie mają linii absorpcyjnych w interesującym

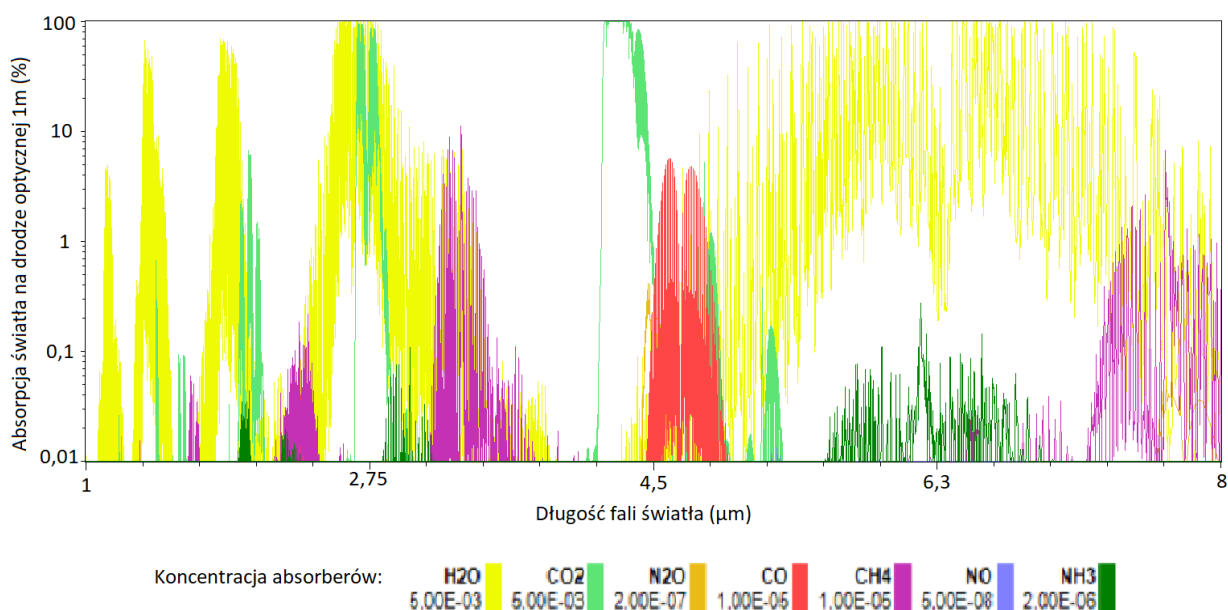
nas zakresie podczerwieni) mogące występować w oddechu w stężeniu co najmniej 15 ppb przedstawiono w tabeli 3 [8].

Tabela 3: Interferenty występujące w wydychanym powietrzu.

Para wodna – H ₂ O	~ 5%
Dwutlenek węgla – CO ₂	~ 5%
Metan – CH ₄	< 10 ppm
Tlenek węgla – CO	< 10 ppm
Amoniak – NH ₃	< 2 ppm
Tlenek azotu (I) – N ₂ O	< 200 ppb
Tlenek azotu (II) - NO	< 50 ppb
Aceton - (CH ₃) ₂ CO	< 1 ppm
Cyjanowodór - HCN	< 15 ppb

Z tabeli 3 wynika, że w szczególności problematyczne są woda i dwutlenek węgla (blisko 5% zawartości w oddechu). Niekorzystne interferencje mogą wykazywać również metan i tlenek węgla (występuje on w szczególności u palaczy). Także inne cząsteczki, pojawiające się w mniejszych stężeniach (w tym również biomarkery innych chorób) mogą interferować z formaldehydem i etanem.

W związku z powyższym konieczna jest analiza, która z wyżej wymienionych substancji może stanowić potencjalny problem podczas detekcji biomarkerów i na jakiej długości fali jej widmo jest najsilniejsze. W tym celu przeprowadzono zgrubną (w szerokim zakresie 1 μm – 8 μm) symulację widm potencjalnych interferentów, której wyniki przedstawiono na rys. 8.



Rysunek 8: Widma interferentów obecnych w oddechu w zakresie 1 – 8 μm .

Zgodnie z przewidywaniami, największy problem mogą stwarzać woda, dwutlenek węgla oraz metan, gdyż ich widmo charakteryzuje się dużym współczynnikiem absorpcji w analizowanym zakresie podczerwieni. Również amoniak i tlenek węgla mogą stanowić przeszkodę w detekcji – choć występującą one lokalnie, ich widmo może być bardzo silne. Należy pamiętać, że szczegółowy skład oddechu jest funkcją osobniczą każdego badanego, a ponadto może zmieniać się w zależności od diety i wysiłku.

Ograniczenie stężenia interferentów w oddechu jest teoretycznie możliwe dla niektórych gazów, takich jak para wodna. W tym celu zasadne jest stosowanie membran nafionowych [⁹⁴] osuszających badany gaz. Należy mieć jednak na uwadze, że komplikuje to dodatkowo układ doświadczalny. Nie jest też znany wpływ tych membran na stężenia biomarkerów, które są przedmiotem badania.

Ostatecznym wnioskiem z powyższej, zgrubnej analizy jest to, że praktycznie w całym zakresie interesującej nas podczerwieni ma miejsce oddziaływanie jakichś interferentów. Nie da się zatem stwierdzić arbitralnie, że dany zakres długości fali jest wolny od zakłóceń. Należało wobec tego przeprowadzić szczegółową analizę każdej linii absorpcyjnej biomarkera pod kątem możliwości jego detekcji w oddechu, co zostało wykonane przy pomocy programu komputerowego opisanego w dalszej części pracy.

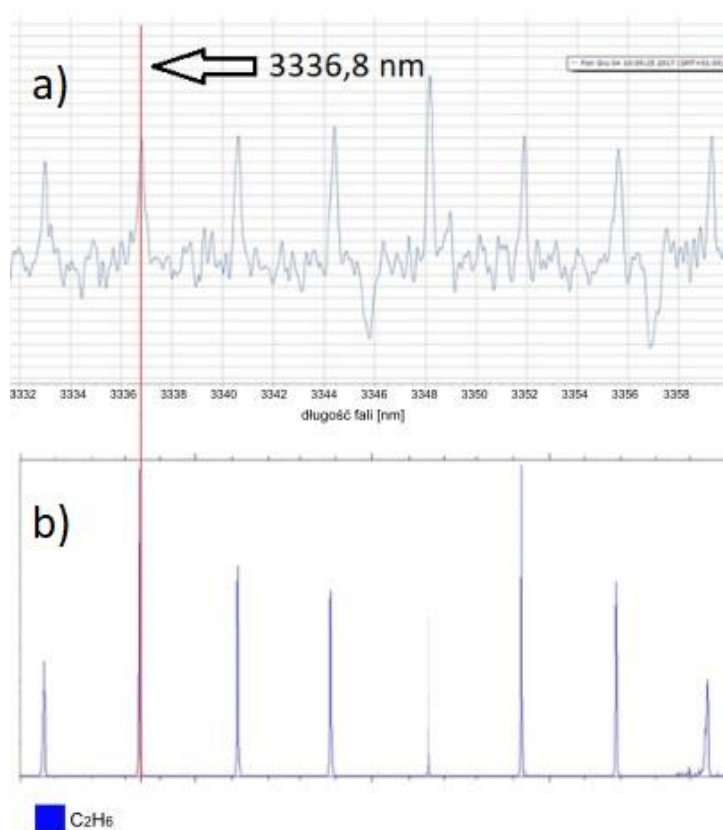
1.8. Wyznaczenie optymalnych długości fali do detekcji biomarkerów

Przed wyborem odpowiednich laserów do detekcji formaldehydu i etanu należało wybrać konkretną długość fali, na której mają one pracować. Ze względu na wąski zakres strojenia (rzędu kilku nanometrów) należało ją określić z dokładnością do pięciu cyfr znaczących.

1.8.1. Porównanie rzeczywistych widm biomarkerów z symulacją

Aby mieć pewność, że długości fal linii absorpcyjnych biomarkerów uzyskanych z bazy HITRAN są zgodne z rzeczywistością, ich widma zostały dodatkowo sprawdzone za pomocą spektrometru fourierowskiego². We współpracy z Wojskową Akademią Techniczną skorzystano z urządzenia Nicolet IS50R wyposażonego w detektor MCT chłodzony ciekłym azotem oraz komórkę wieloprześciową o drodze optycznej 10 metrów. Prowadzono pomiary etanu wytwarzanego za pomocą generatora KINTEK, formaliny, metanolu oraz acetaldehydu. Doświadczenia związane z wykrywaniem dwóch ostatnich substancji w dalszej części pracy doktorskiej nie były kontynuowane.

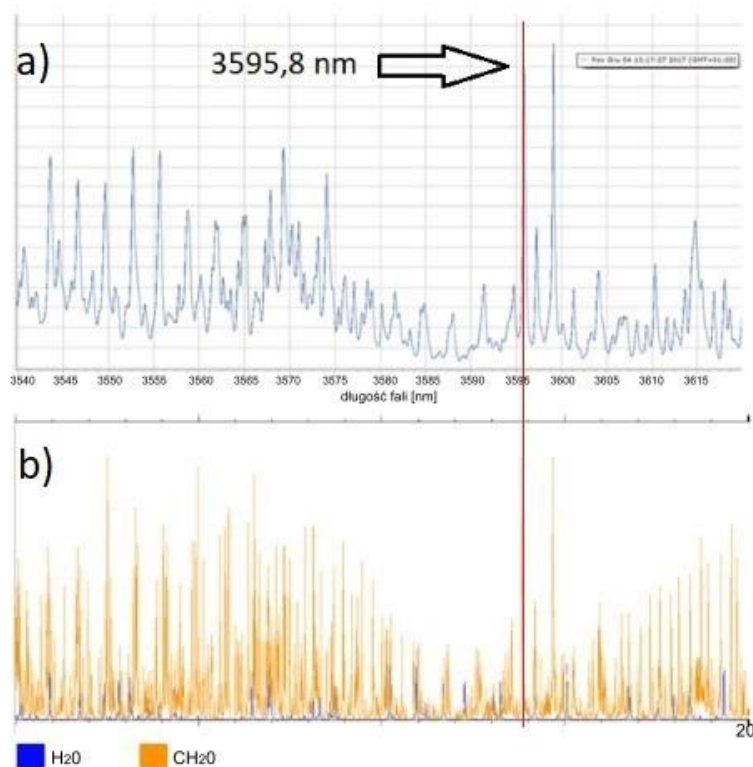
² Badania te przeprowadzono we współpracy z Zespołem Detekcji Sygnałów Optycznych Instytutu Optoelektroniki Wojskowej Akademii Technicznej (prof. dr hab. Jacek Wojtas).



Rysunek 9: Widmo etanu: eksperyment (a) i symulacja (b).

Porównanie wyników pomiarów i symulacji na podstawie bazy HITRAN dla etanu i formaldehydu przedstawione jest odpowiednio na rys. 9 i 10. W obu przypadkach górny wykres przedstawia widmo zmierzone za pomocą spektrometru, podczas gdy na dolnym pokazane są wartości wygenerowane z bazy HITRAN. Zakresy prezentowanych długości fali wybrane zostały na podstawie programu komputerowego służącego do analiz linii widmowych opisanego w rozdziale 1.8.2. Czerwoną linią oznaczone zostały te, na których prowadzona będzie detekcja biomarkerów. W przypadku formaldehydu w symulacji uwzględniono również widmo wody, ponieważ do eksperymentu użyto formaliny (wodny roztwór formaldehydu).

W przypadku każdej z wyżej wymienionych substancji linie absorpcyjne (pod względem długości fali) zarówno dla pomiaru, jak i symulacji pokrywają się. Występują pewne różnice pod względem ich amplitudy. Zebrane dane pozwoliły na prawidłowy wybór laserów do detekcji biomarkerów.



Rysunek 10: Widmo formaldehydu - eksperyment (a) i symulacja (b).

1.8.2. Program do analizy widm biomarkerów i interferentów

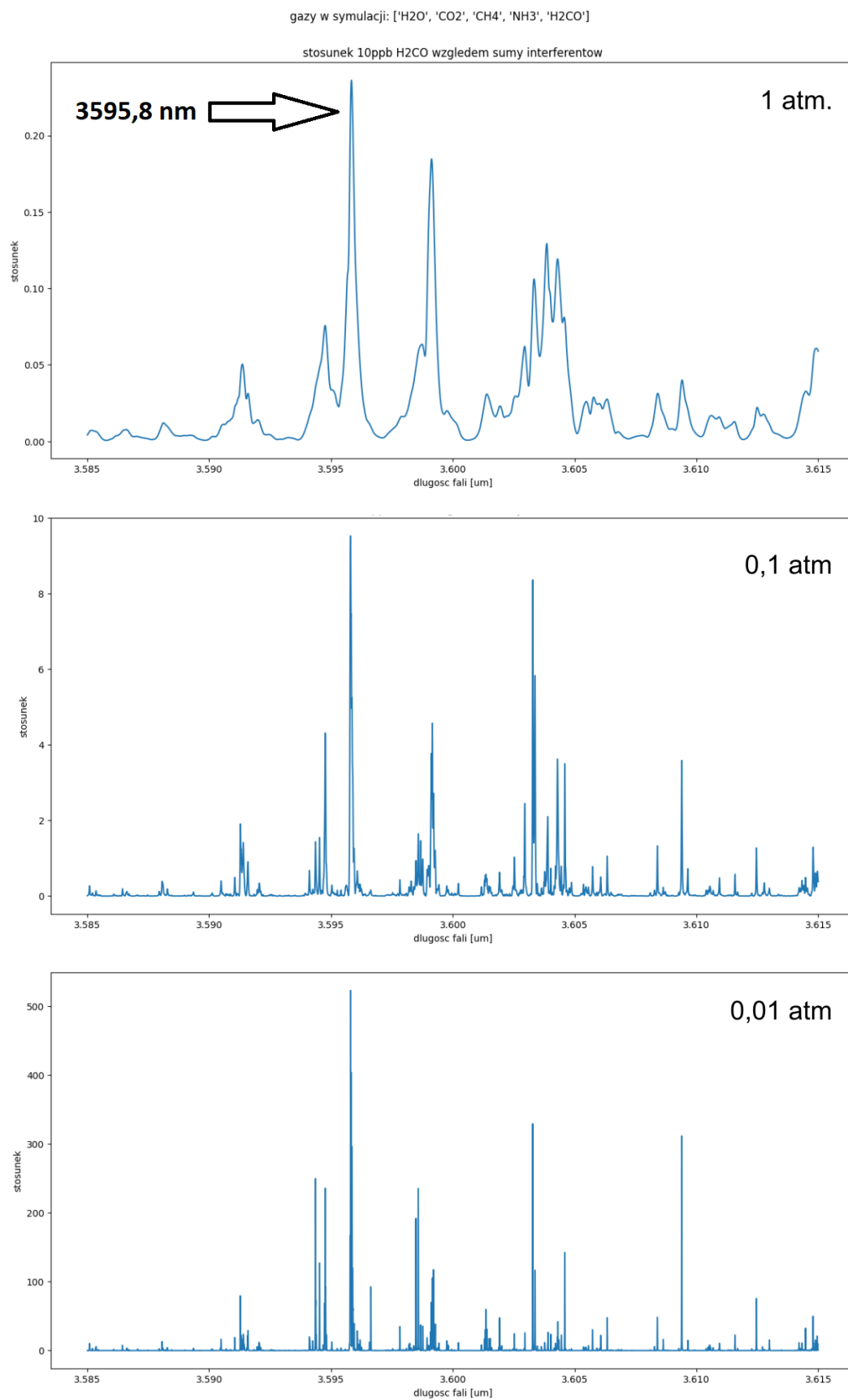
W celu znalezienia silnej, a jednocześnie możliwie najmniej zakłóconej przez interferenty linii absorpcyjnej formaldehydu i etanu, w ramach niniejszej pracy doktorskiej przygotowany został program w języku *Python*, który bazując na danych z biblioteki HITRAN dokonał analizy całego widma w zakresie od 1 do 8 mikrometrów. Z jego użyciem obliczano stosunek absorpcji interesującego biomarkera do sumy interferentów występujących w oddechu dla każdej długości fali z krokiem 0,01 nm. W przypadku gdy nie jest on istotnie większy od jedności detekcja nie jest selektywna. Pozwoliło to wybrać optymalną linię absorpcyjną i zaplanować zakup odpowiedniego lasera. Analizę przeprowadzano dla różnych ciśnień w zakresie od 0,01 atm. do 1 atm.

Wyniki działania programu dla formaldehydu prezentuje rys. 11. Dla większej przejrzystości pokazano jedynie wycinek widma w interesującym pod kątem detekcji tego biomarkera zakresie. Założono stężenie 10 ppb (przewidywana czułość docelowa urządzenia).

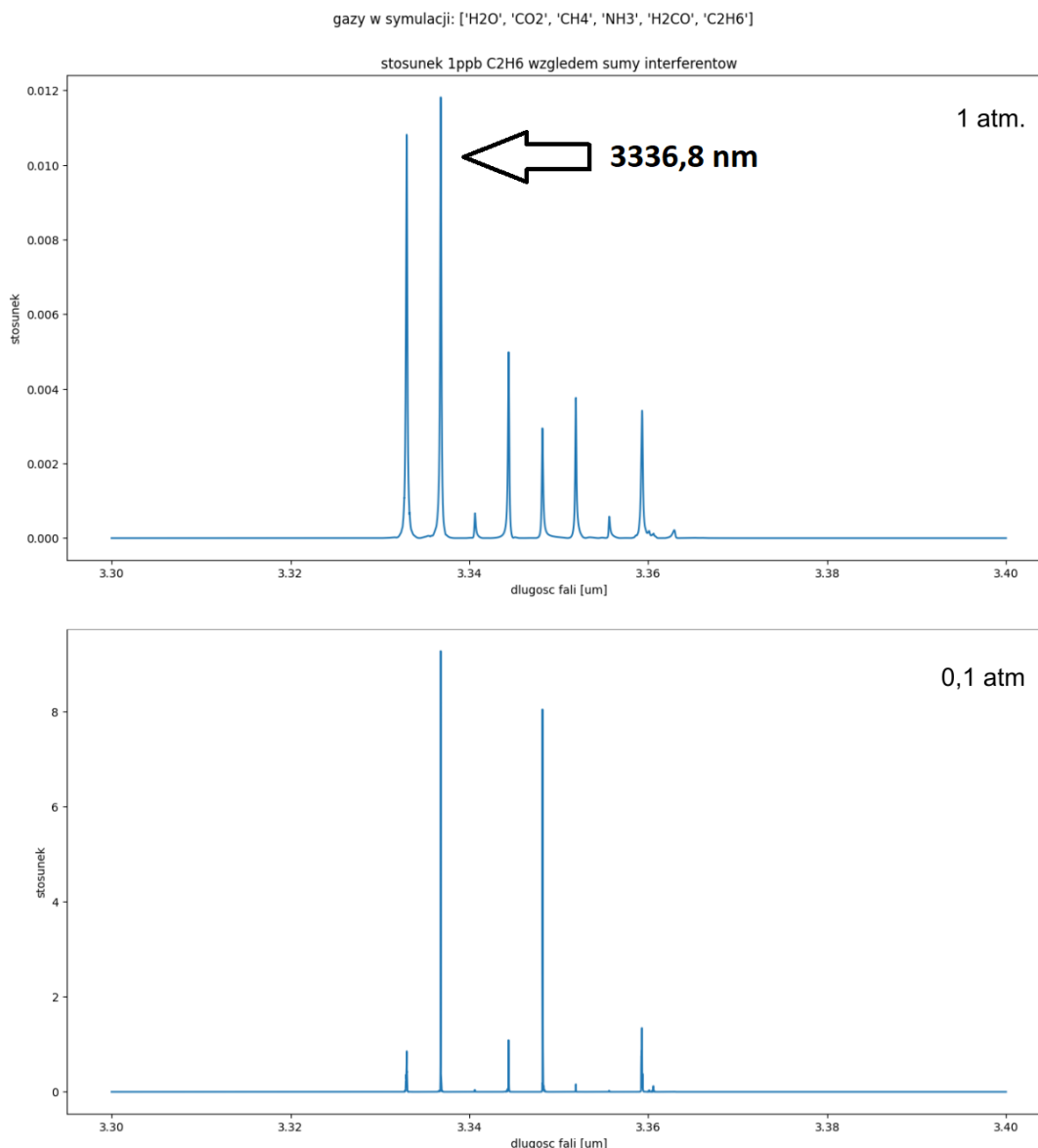
Analiza wykazała, że wykrywanie formaldehydu z wymaganą czułością bezpośrednio w oddechu nie jest możliwe pod ciśnieniem atmosferycznym. W związku z powyższym przeprowadzono dodatkową symulację dla ciśnienia obniżonego do 0,1 atm. Dzięki zmniejszeniu poszerzenia zderzeniowego linie ulegają separacji i pojawia się możliwość detekcji formaldehydu na kilku z nich, przy czym najmniej zakłócona ma długość fali 3595,83 nm. Dalsze obniżanie ciśnienia do 0,01 atm powoduje zwiększanie stosunku

absorpcji biomarkera do interferentów oddechowych. W tym wypadku interferencje z pozostałymi składnikami oddechu nie powinny być już mieralne.

Podobna analiza została przeprowadzona dla etanu. Założenia co do detekcyjności dla tego biomarkera przyjmowały konieczność wykrywania stężeń na poziomie pojedynczych ppb. Rys. 12 przedstawia szczegółowe dane dla pasma $3,3\text{ }\mu\text{m}$, optymalnego pod kątem detekcji tego gazu. Podobnie jak w przypadku formaldehydu, nie ma możliwości wykrywania śladowych ilości tego biomarkera w wydychanym powietrzu bez obniżania ciśnienia. Z symulacji przeprowadzonej dla $0,1\text{ atm.}$ wyraźnie wynika, że zmniejszenie ciśnienia próbki powoduje znaczne zmniejszenie wpływu interferentów na pomiar absorpcji – a tym samym koncentracji etanu. Optymalna linia absorpcyjna ma długość fali $3336,80\text{ nm.}$



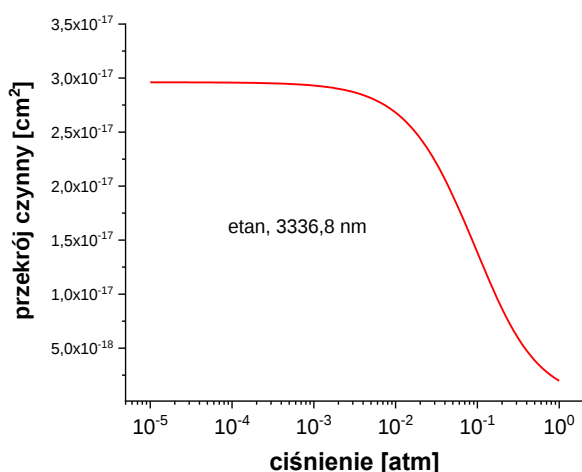
Rysunek 11: Stosunek wartości współczynników absorpcji formaldehydu (10 ppb) względem interferentów występujących w oddechu.



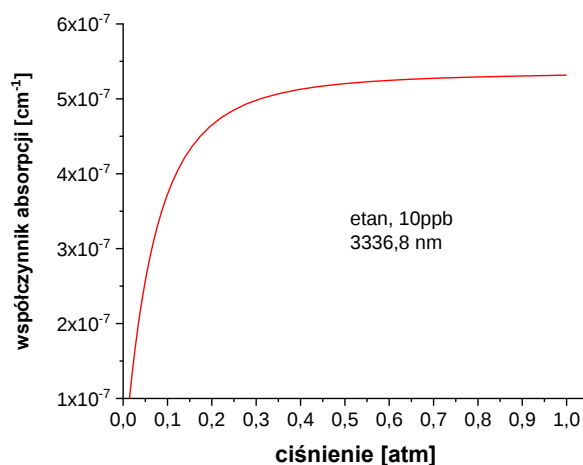
Rysunek 12: Stosunek wartości współczynników absorpcji etanu (1 ppb) względem interferentów występujących w oddechu.

Analizując sam stosunek absorpcji biomarkera do interferentów (traktując go w pewnym sensie jako stosunek sygnału do szumu) można odnieść błędne wrażenie, że zmniejszanie ciśnienia gazu jest zawsze korzystne, stąd też początkowo może dziwić brak symulacji dla jeszcze niższych ciśnień – 0,001 atm. dla formaldehydu i 0,01 atm. dla etanu. Obniżając ciśnienie zmniejsza się jednocześnie liczbę absorbujących molekuł. W celu numerycznego zobrazowania tego zjawiska napisano drugi program, obliczający na podstawie symulacji z wykorzystaniem bazy HITRAN przekrój czynny na absorpcję linii etanu 3336,80 nm pod różnymi wartościami ciśnienia (rys. 13). Zgodnie z teorią, w zakresie ciśnień dla których dominującym zjawiskiem jest zderzeniowe poszerzenie linii, przekrój

czynny na absorpcję zwiększa się wraz z obniżaniem ciśnienia. Obliczonych wartości σ użyto do obliczenia współczynnika absorpcji tego gazu zgodnie ze wzorem (1.4.2) i przedstawiono na rys. 14.



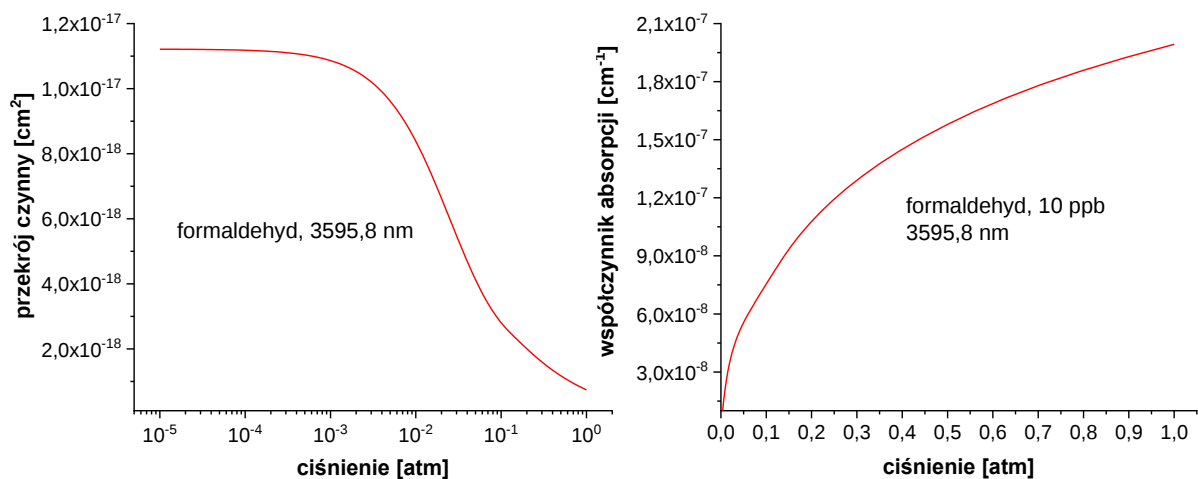
Rysunek 13: Przekrój czynny na absorpcję etanu w funkcji ciśnienia.



Rysunek 14: Współczynnik absorpcji etanu w funkcji ciśnienia.

Wniosek z symulacji jest następujący: wzrost przekroju czynnego nie jest w stanie skompensować spadku liczby absorbujących cząstek i współczynnik absorpcji (a co za tym idzie pochłanianie światła przy danej drodze optycznej, zgodnie ze wzorem 1.4.1) maleje wraz z obniżaniem ciśnienia. Wiąże się to bezpośrednio z minimalną możliwą do wykrycia koncentracją badanej substancji.

Warto jednak zauważyć, że nie jest to zależność liniowa. Dla względnie wysokiego ciśnienia (powyżej 1/3 atmosfery) spadek jest niewielki i nie przekracza 10%. Dalsze jego obniżanie poniżej tej wartości ma sens jedynie wtedy, kiedy pozwala w istotny sposób zmniejszyć niepożądany efekt nakładania się widm innych substancji (interferentów) na badaną cząsteczkę. W przypadku zaprezentowanej na wykresie linii absorpcyjnej etanu, dla ciśnienia wynoszącego 0,1 atm. jego współczynnik absorpcji spada o prawie połowę, natomiast dla 0,01 atm. – aż siedmiokrotnie. Biorąc pod uwagę fakt, że 0,1 atm zapewnia wystarczające do przeprowadzenia eksperymentu zmniejszenie wpływu interferentów na pomiar koncentracji, dalsze obniżanie ciśnienia nie jest zasadne.



Rysunek 15: Przekrój czynny na absorpcję formaldehydu w funkcji ciśnienia.

Rysunek 16: Współczynnik absorpcji formaldehydu w funkcji ciśnienia.

Podobną analizę przeprowadzono dla formaldehydu (rys. 15). W przypadku tego biomarkera sytuacja – z uwagi na specyficzny, złożony kształt widma – wygląda nieco gorzej niż dla etanu. Po obniżeniu ciśnienia do 0,1 atm. współczynnik absorpcji maleje o ponad połowę, natomiast dla 0,01 atm. – prawie dziewięciokrotnie (rys. 16).

Część II - doświadczalna

2.1. Wybór odpowiedniej ultraczułej metody do planowanych zastosowań

Jak wspomniano w rozdziale 1.5, spośród ultraczułych metod spektroskopii laserowej do detekcji etanu i formaldehydu wybrano spektroskopię wieloprzejsiową. Systemy te są bardziej stabilne od układów wykorzystujących wnękę optyczną, co stanowi istotną zaletę z punktu widzenia pracy poza laboratorium. Uzyskanie wysokiej czułości w układach CDRS wymaga nie tylko dobrej synchronizacji długości fali lasera z linią absorpcyjną badanego związku, ale także dopasowania do nich częstości modu wnęki [95].

Współczynnik absorpcji światła podczerwonego na długościach fali wybranych w wyniku analizy przeprowadzonej w rozdziale 1.8 dla formaldehydu i etanu przedstawiony został w tabeli 4.

Tabela 4: Współczynniki absorpcji biomarkerów będących przedmiotem badań.

Biomarker	Koncentracja	Długość fali	Ciśnienie	Wsp. absorpcji
formaldehyd	100 ppb	3595,78 nm	0,01 atm.	$2,27 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$
etan	10 ppb	3336,80 nm	0,1 atm.	$3,72 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^{-1}$

Można oszacować, że przy zastosowaniu komórki wieloprzejsiowej o długości drogi optycznej rzędu 10 m absorpcja światła będzie wielkością mierzalną przy założonych w tabeli 4 warunkach.

2.1.1. Projekt komórki wieloprzejsiowej

W ramach niniejszej pracy doktorskiej postanowiono skonstruować własną komórkę multipass. Jak wspomniano, wymagana droga optyczna powinna być nie mniejsza niż 10 metrów. Z kolei maksymalna długość całości układu doświadczalnego – rzędu 1 metra – pozwoli na zachowanie jego mobilności. Dla uproszczenia justowania układu optycznego zdecydowano się na komórkę zawierającą dwa lustra, przy czym w jednym z nich znajduje się otwór wejściowy, a w drugim wyjściowy wiązki lasera.

Istnieją pewne ogólne zasady dotyczące projektowania komórek wieloprzejsiowych. Po pierwsze – ten system jest stabilny, gdy ogniskowa zwierciadeł (F) i ich wzajemna odległość od siebie (sep) spełniają zależność: $sep < 4F$. W praktyce stosuje się warunek $sep < 2F$, ponieważ dla dłuższych konstrukcji płamki lasera na lustrach stają się zbyt duże. Prowadzi to do ich nakładania się i niepożądanych interferencji, tak zwanych szumów optycznych. Jest to zjawisko występujące w układach optycznych (w szczególności w omawianej technice), które ogranicza czułość pomiaru. Zostało ono opisane szerzej w rozdziale 2.1.2. Należy również pamiętać, że przy pewnym specyficznym doborze parametrów:

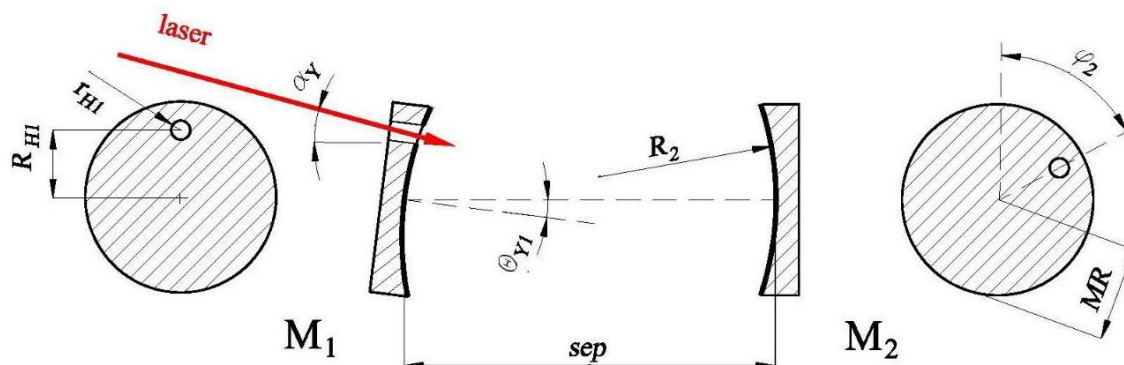
$$\frac{sep}{2F} = 1 - \cos\left(\frac{\pi}{m}\right) \quad (2.1.1)$$

gdzie m jest liczbą naturalną – może powstać niepożądany rezonans optyczny.

Niestety, nie istnieje prosty i uniwersalny wzór pozwalający na szybkie i skuteczne zaprojektowanie komórki wieloprzejsiowej. Jak zostało to pokazane poniżej, jej własności

zależą od wielu parametrów. Praca metodą prób i błędów jest czasochłonna, a poza tym nie gwarantuje znalezienia optymalnego rozwiązania.

W celu usprawnienia procesu projektowania komórki wieloprześciowej w ramach realizacji niniejszej pracy powstał dedykowany program do symulacji komórek Herriota. Program, nad którym autor pracy pełnił nadzór został napisany w języku *Python* i udostępniony bezpłatnie na licencji GNU GPL [96]. Zawiera przejrzysty interfejs graficzny. Symulacja jest prowadzona z wykorzystaniem praw optyki geometrycznej. Parametry swobodne komórki zaprezentowane są na rys. 17.



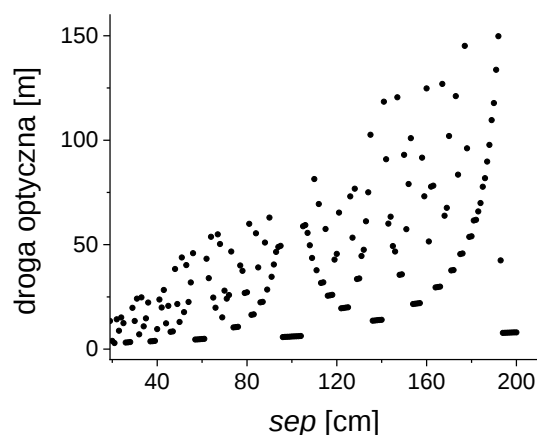
Rysunek 17: Schemat komórki wieloprześciowej wraz z rzutami jej zwierciadeł (M_1 i M_2). Symbolami oznaczono parametry swobodne stosowane w programie symulacyjnym.

Na rys. 17 wielkość MR oznacza promień zwierciadła. Każde z nich ma również promień krzywizny (R_1 i R_2). Oba te parametry najczęściej są jednakowe dla obu lusterek. Kolejnymi zmiennymi są odległość między zwierciadłami (sep), a także średnice otworów dla wiązek wejściowej i wyjściowej lasera (r_{H1} i r_{H2}) oraz odległości tych otworów od środka zwierciadła (R_{H1} i R_{H2}). Należy jeszcze określić pozostałe stopnie swobody, a zatem:

- kąty pochylenia zwierciadeł względem osi komórki (θ_{x1} , θ_{y1} , θ_{x2} , θ_{y2}),
- kąty obrotu ich otworów względem prostej wertykalnej do osi komórki (ϕ_1 , ϕ_2),
- kąty wprowadzania wiązki laserowej względem osi komórki (α_x , α_y).

Użytkownik wprowadza do programu konkretne wartości lub ich dopuszczalny zakres. W tym drugim przypadku interfejs graficzny umożliwia płynną regulację wartości wymienionych parametrów za pomocą odpowiednich suwaków na ekranie. Program zawiera również funkcję optymalizacji komórki wieloprześciowej dokonywaną metodą Monte Carlo.

Symulacja mająca na celu sprawdzenie możliwości do uzyskania drogi optycznej wykazała, że dla określonych parametrów jej wartość może wielokrotnie przekraczać założone dziesięć metrów dla $sep \sim 1$ m (rys. 18).



Rysunek 18: Symulacja drogi optycznej komórki wieloprzejsiowej ze zwierciadłami o promieniu krzywizny $R_1 = R_2 = 200$ cm.

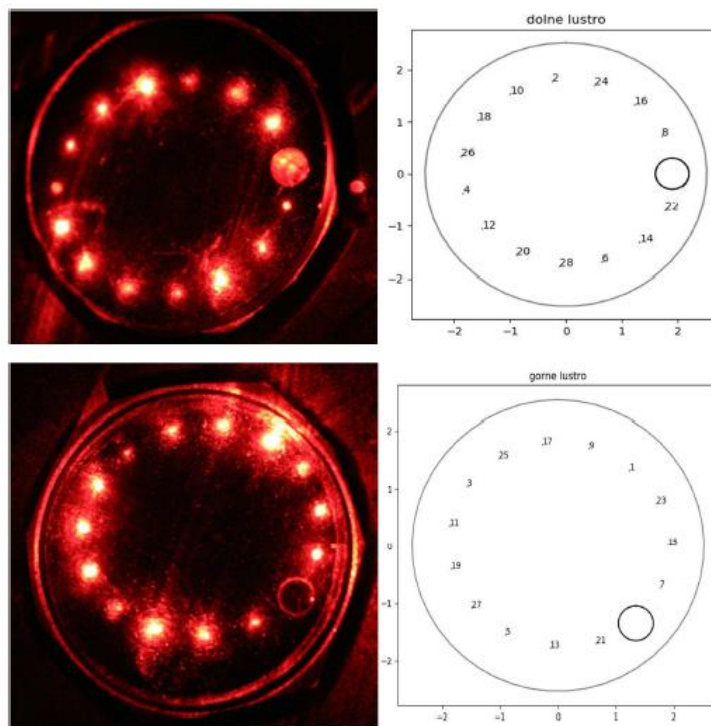
W związku z osiągniętym rezultatem przystąpiono do optymalizacji projektu komórki pod kątem jej stabilności, prostoty wykonania oraz justowania układu, ze szczególnym uwzględnieniem konieczności uszczelnienia próżniowego. Przed uruchomieniem optymalizacji wprowadzono do oprogramowania następujące wymagania:

- dwa trwale niepochyłane ($\Theta_{X1} = \Theta_{Y1} = \Theta_{X2} = \Theta_{Y2} = 0$) zwierciadła dwucalowe (promień – jeden cal) o promieniu krzywizny dwóch metrów, równoległe do siebie;
- rozmiary otworów w lustrach – sześć milimetrów, odległość środka otworu od środka zwierciadła – dziewiętnaście milimetrów;
- stabilne rozwiązanie o dużej tolerancji – odległość między środkami plamek lasera minimum siedem milimetrów oraz taka sama odległość między środkiem plamki a krawędzią lustra lub otworu, celem zapobiegania nakładania się plamek lasera i ich interferencji;
- odległość między zwierciadłami nie większa niż 70 centymetrów, z uwagi na pożądany kompaktowy rozmiar komórki;
- justowanie jedynie poprzez zmianę kąta wprowadzenia lasera i obrót lustra wyjściowego (brak konieczności pochylania luster);
- pożądane uzyskanie co najmniej 10 metrów drogi optycznej;
- otwór wejściowy i wyjściowy znajdują się na innych zwierciadłach.

W wyniku pracy programu otrzymano następujące wartości parametrów komórki:

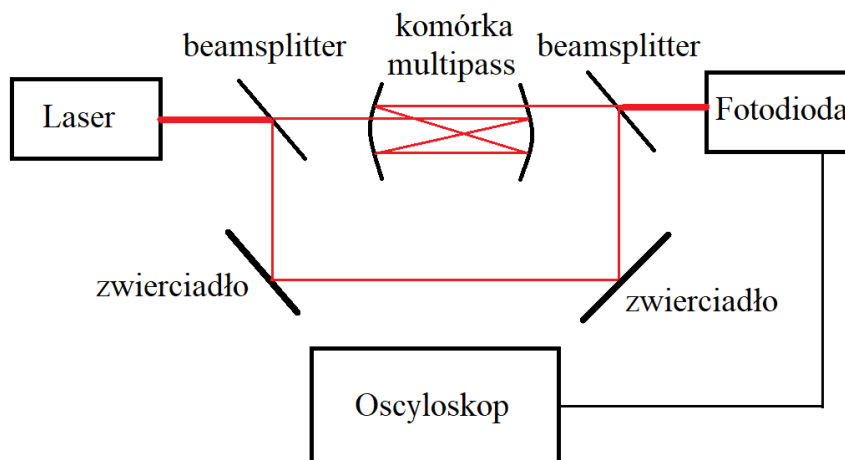
- rozstaw zwierciadeł $sep = 66,3$ cm;
- kąt wprowadzania lasera $\alpha_x = -0,01$ rad;
- kąt wprowadzania lasera $\alpha_y = -0,02$ rad;
- zwierciadła równoległe i niepochyłane ($\Theta_{X1} = \Theta_{Y1} = \Theta_{X2} = \Theta_{Y2} = 0$ rad);
- odległość między środkami plamek lasera 7,07 mm na zwierciadłach;
- obrót zwierciadła wyjściowego φ_2 : 45 stopni względem wejściowego φ_1 ;
- droga optyczna 18,85 m (29 przejść przez komórkę, po 14 odbić lasera na lustro);

Po uzyskaniu rezultatów teoretycznych, przed zleceniem wykonania właściwej komórki wieloprześciowej zbudowano prototyp w układzie otwartym, tj. bez szklanego cylindra umożliwiającego pracę w próżni. Został on zestawiony na stole optycznym ściśle według obliczonych parametrów. Do eksperymentu użyto lasera pracującego w zakresie widzialnym (czerwony). Uzyskany rozkład plamek (wzór odbić) na zwierciadłach jest zgodny z wynikiem symulacji wygenerowanej przez program, co przedstawiono na rys. 19.



Rysunek 19: Porównanie wyników symulacji z układem fizycznym.

Po udanym zestawieniu komórki według obliczonych przez program parametrów przeprowadzono dodatkowy eksperyment, w którym droga optyczna została zmierzona przez porównanie czasu przelotu impulsu lasera przez komórkę wieloprześciową i z jej pominięciem. Schemat układu pomiarowego przedstawiono rys. 20.



Rysunek 20: Schemat układu do pomiaru drogi optycznej prototypowej komórki wieloprześciowej.

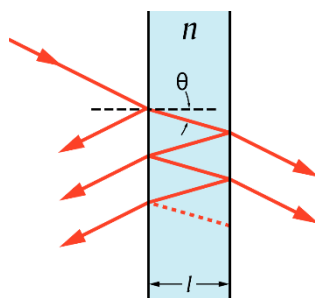
Na podstawie zmierzonego opóźnienia impulsu laserowego przechodzącego przez komórkę wieloprześciową względem referencyjnej wiązki lasera wyznaczono długość drogi optycznej w badanym układzie zgodnie ze wzorem $L = c\Delta t$, gdzie c jest prędkością światła. Zmierzone opóźnienie Δt wynosiło 62 ± 1 ns, co odpowiada drodze optycznej $18,6 \pm 0,3$ m. Jest to wynik zgodny z symulacją (18,85 m).

Po wstępnym eksperymencie w układzie otwartym przystąpiono do mechanicznego wykonania właściwej komórki wieloprześciowej. Skonstruowany układ, z uwagi na brak konieczności stosowania kiwaczy zwierciadeł charakteryzował się bardzo dobrą szczelnością. Po odpompowaniu zawartości i pozostawieniu na kilkanaście godzin ciśnienie w jej wnętrzu nie wzrastało o więcej niż jedną dwusetną atmosfery. Dodatkowo, opracowana komórka była bardzo stabilna – nie ulegała rozjustowaniu mimo wielokrotnych, gwałtownych zmian ciśnienia w jej wnętrzu i przez ponad rok używania ani razu nie wymagała ponownego strojenia.

2.1.2. Zakłócenia optyczne w systemach z komórkami wieloprześciowymi

Badania komórki wykazały, że jej widmo transmisji nie jest płaskie: charakteryzuje się periodycznymi zafalowaniami. Przyczyną tego są zakłócenia optyczne – pojawiające się w wielu układach doświadczalnych.

Zakłócenia optyczne, zwane niekiedy szumem optycznym (ang. *optical noise*), powstają w wyniku niepożądanych interferencji światła lasera. Prowadzą do modulacji widma transmisji układu optycznego. W przypadku pomiarów absorpcji światła modulacja ta może nakładać się na obserwowane widmo absorpcyjne zakłócając pomiar. Poglądowy rys. 21 przedstawia istotę problemu.



Rysunek 21: Model interferencji w układach optycznych [97].

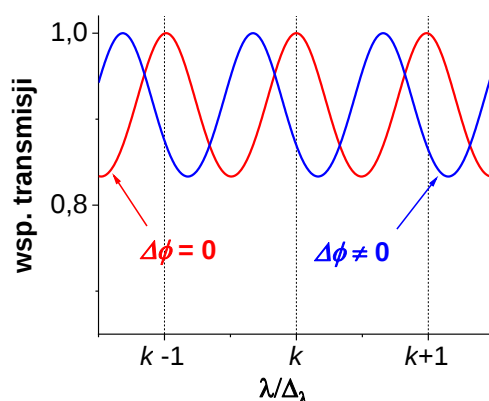
W podstawowym opisie tego zjawiska rozważa się szklaną płytkę płasko-równoległą. Jej grubość oznaczamy jako l , a współczynnik załamania jako n . Płytkę znajduje się w powietrzu, na jej granicy część światła padającego pod kątem θ do osi normalnej jest odbijane. Zjawisko zachodzi wielokrotnie, a nakładanie się kolejnych wiązek prowadzi do ich interferencji. W rezultacie pojawiają się periodyczne prążki w widmie transmisyjnym. Transmisja płytki jest opisana wtedy wzorem:

$$T(\lambda) = \frac{1}{1 + Q \sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right)} \quad (2.1.2.1)$$

gdzie $Q = 4R/(1-R)^2$ oznacza parametr dobroci rezonansu (ang. *finesse*), R jest współczynnikiem odbicia, a $\delta = \frac{4\pi l n \cos(\theta)}{\lambda}$. Przy padaniu prostopadłym współczynnik odbicia wyraża się wzorem $R = \frac{(1-n)^2}{(1+n)^2}$, a wyraz δ opisany jest przez:

$$\delta = \frac{4\pi l n}{\lambda} + \Delta\beta + \Delta\varphi \quad (2.1.2.2)$$

gdzie λ jest długością fali, a $\Delta\beta$ opisuje przesunięcie fazowe podczas odbicia. Wynosi ono $\Delta\beta = 0$ gdy następuje dalsza propagacja światła w szkłe lub $\Delta\beta = \pi$ jeśli promień propaguje się w powietrzu [33]. Dodatkowo należy uwzględnić przesunięcie fazowe $\Delta\varphi$ wynikające z niejednorodności grubości płytki oraz – na ogół zależne od czasu – zmiany wartości l spowodowane rozszerzalnością termiczną.



Rysunek 22: Widmo transmisji płytki płaskorównoległej dla $n = 1,47$.

Dwa przypadki modulacji transmisji dla dwóch różnych przesunięć fazowych $\Delta\varphi$ pokazano na rys. 22.

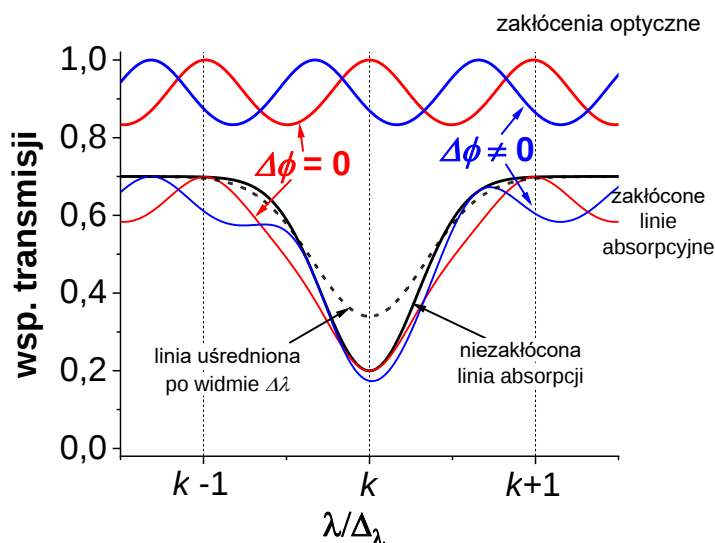
Dla typowego szkła BK7 używanego w optyce współczynnik załamania wynosi $n = 1,47$, a współczynnik odbicia $R = 3,6\%$. Amplituda modulacji transmisji światła przez płytkę oscyluje w granicach $0,865 < T \leq 1$ (rys. 22), a odległość widmowa prążków może być przybliżona wzorem:

$$\Delta\lambda \approx \frac{\lambda^2}{2nd} \quad (2.1.2.3)$$

Efekt ten prowadzi do zaburzeń widma transmisji światła w wieloelementowym układzie optycznym. Zazwyczaj redukuje się go poprzez stosowanie warstw antyodbiciowych lub klinowych okien optycznych, umieszczonych nieprostopadle do padającej wiązki światła. Również taka budowa układu optycznego, aby wiązki padające i odbite nie zachodziły na siebie, zapobiega powstawaniu interferencji. Niestety, w niektórych konstrukcjach uniknięcie szumów optycznych za pomocą tych metod nie jest możliwe. Należą do nich w szczególności komórki wieloprzejściowe.

Aby zminimalizować interferencje w komórce, należy dążyć, by plamki lasera nie pokrywały się ze sobą. Zjawiska tego nie da się jednak całkowicie wyeliminować, zwłaszcza w układach o długiej drodze optycznej i małej powierzchni zwierciadeł, a więc przy wielu

plamkach. Wiązki światła są rozbieżne na skutek dyfrakcji, a także ulegają rozpraszaniu na niedoskonałościach powierzchni lustra oraz w ośrodku wypełniającym komórkę. Prowadzi to do periodycznych zakłóceń, których mechanizm powstawania jest analogiczny do generacji prążków w płytkach płaskorównoległych. Zakłócenia te nakładają się na widmo transmisji badanych gazów. Z uwagi na fakt, że komórki wieloprześciowe są stosowane do pomiaru słabej absorpcji, zazwyczaj w doświadczeniu ich transmisja jest jedynie nieznacznie modulowana przez gazy wypełniające przestrzeń między zwierciadłami. Dodatkowe, niepożądane i zazwyczaj wolnozmiennie w czasie oscylacje wprowadzane do widma przez szumy optyczne mogą znacznie utrudnić pomiar i zmniejszyć jego czułość.



Rysunek 23: Zakłócenia optyczne linii absorpcyjnej dla różnych przesunięć fazowych.

Symulację przykładowych szumów optycznych dla niewielkiej (typowo spotykanej) dobroci ($F = 0,2$) i ich oddziaływanie na badane widmo pochłaniania pokazano na rys. 23. Linia absorpcyjna, będąca przedmiotem badania, ma kształt gaussoński (w kolorze czarnym). Szumy optyczne (przebiegi periodyczne zaznaczone kolorem niebieskim i czerwonym) nakładają się na nią, prowadząc do jej zniekształceń (dolne linie w kolorze czerwonym i niebieskim). Niestabilność czasowa $\Delta\phi$ powoduje, że tego rodzaju zakłóceń nie można skompensować (np. odjąć) podczas późniejszej obróbki danych wykorzystując widmo szumów zarejestrowane podczas testowania układu eksperymentalnego. Z uwagi na fakt, że w eksperymencie faza szumów nie jest stała, na rys. 23 uwzględniono różne przesunięcia $\Delta\phi$. Jeden okres oscylacji odpowiada zmianie długości układu będącego źródłem szumów o długość $\Delta d = \lambda_0/2n$. Typowa odległość między zwierciadłami w komórkach wieloprześciowych wynosi zwykle od kilkunastu centymetrów do ponad metra, stąd powszechnie występują w nich niestabilności o długości rzędu Δd lub większych spowodowane drganiami akustycznymi i rozszerzalnością cieplną. Jest to źródło niestabilności fazy szumów optycznych w czasie. Jak widać w istotny sposób zakłócają one widma transmitowane przez układ, przez co silnie wpływają na wykrywalność śladowych ilości gazów.

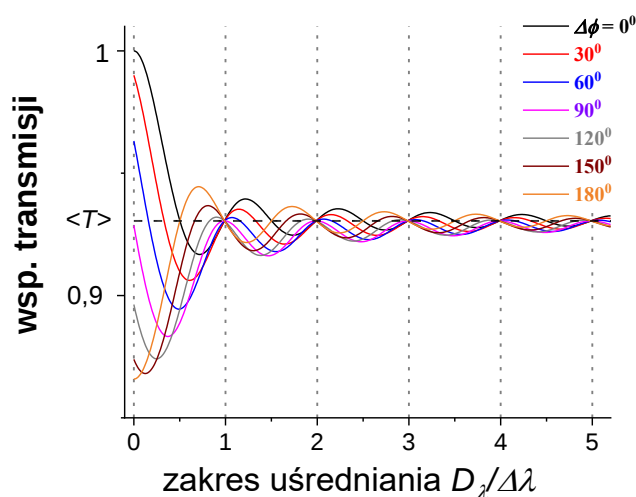
Problem ten jest powszechny w wieloprześciowej spektroskopii absorpcyjnej i wiele grup badawczych próbowało go rozwiązać na różne sposoby [⁹⁸, ⁹⁹]. Najprostsza metoda

polega na zwiększeniu odległości pomiędzy plamkami lasera na zwierciadłach, co wiąże się z ograniczeniem liczby odbić wewnątrz komórki. Niestety, skraca to drogę optyczną i w związku z tym zmniejsza czułość układu. Innym możliwym rozwiązaniem jest ograniczenie średnicy wiązki lasera za pomocą przysłony, ale prowadzi to do dyfrakcji i tworzenia się dysków Airy'ego, które mogą nakładać się na inne plamki lasera na lustrach. Istnieją również rozwiązania polegające na zastosowaniu wewnątrz komórek specjalnych masek oddzielających wiązki od siebie [100, 101]. Inne podejścia polegają na okresowym przesuwaniu (co najmniej) jednego ze zwierciadeł przez elementy piezoelektryczne [102, 103] lub poprzez modulację ciśnienia [104]. Stosowane są również wibrujące płytki Brewstera lub soczewki [105, 106]. Wadą tych metod jest znaczna komplikacja systemu pomiarowego lub niemożność ich zastosowania, gdy używana jest gotowa, komercyjna komórka wieloprześciowa.

2.1.3. Redukcja szumów optycznych poprzez modulację długości fali

Opracowana podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej metoda redukcji niepożądanych zakłóceń polega na zastosowaniu modulacji długości fali lasera w pewnym (ściśle określonym i zależnym od długości komórki) zakresie widmowym (D_λ), połączonej z uśrednianiem rejestrowanego sygnału. Jest to konieczne do osiągnięcia czułości rzędu pojedynczych cząsteczek na miliard – jak w przypadku detekcji etanu i formaldehydu, zgodnie z założeniami przedstawionymi w rozdziale 1.2.

Wyniki zastosowania tego podejścia dla interferencji z rys. 22 przedstawiono na rys. 24, gdzie pokazano zmiany transmisji układu w funkcji widmowego zakresu uśredniania dla różnych wartości $\Delta\phi$. Najbardziej efektywna jest modulacja w zakresie długości fal odpowiadającym kolejnym krotnościom okresu szumów optycznych ($D_\lambda/\Delta\lambda = 1, 2, 3\dots$), ponieważ w tym przypadku transmisja nie zależy od zmiennego w czasie przesunięcia fazowego $\Delta\phi$ i jest równa średniej wartości $\langle T \rangle = (1 - R)^2$.

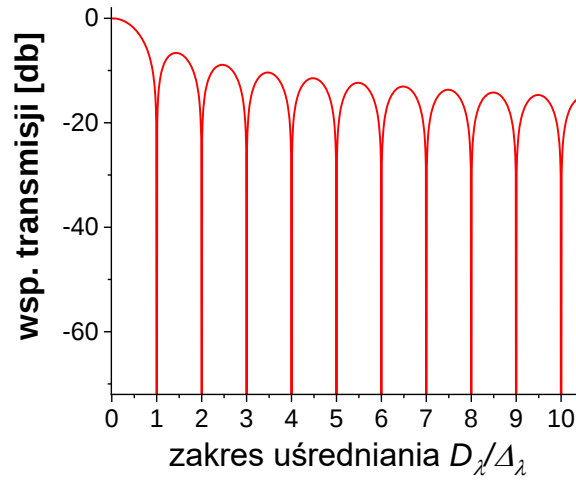


Rysunek 24: Transmisja układu w funkcji widmowego zakresu uśredniania dla różnych wartości $\Delta\phi$.

Operacja, którą zastosowano na funkcji transmisji układu optycznego $T(\lambda)$ generując rys. 24 zwana jest „biegnącą średnią” i może być przedstawiona równaniem:

$$\langle T(\lambda, D_\lambda) \rangle = \frac{1}{D_\lambda} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} T(x) dx \quad (2.1.3.1)$$

gdzie D_λ oznacza zakres uśredniania. Metoda ta często używana jest do wygładzania danych w analizie sygnałów. W elektronice (w szczególności przetwornikach analogowo-cyfrowych typu sigma-delta) tego typu operacja nosi nazwę *filtru sinc*. Jego transmitancja przedstawiona jest na rys. 25. Filtr ten, poza ogólną charakterystyką dolnoprzepustową, bardzo skutecznie tłumi częstotliwości rezonansowe, tj. takie, dla których zakres uśredniania D_λ jest wielokrotnością okresu prążków Δ_λ , czyli gdy spełniony jest warunek: $D_\lambda/\Delta_\lambda = 1, 2, 3...$



Rysunek 25: Transmisja filtru typu „biegnąca średnia”.

Zakłócenia optyczne (opisane w rozdziale 2.1.2) w komórce wieloprzejsiowej powodują modulację funkcji jej transmisji, co można przedstawić wzorem:

$$T(\lambda) = \left[1 + \frac{4R}{(1-R)^2} \sin^2 \left(\frac{2\pi d n}{\lambda} + \Delta\varphi \right) \right]^{-1} \quad (2.1.3.2)$$

Okres oscylacji opisany jest wzorem 2.1.2.3. Z uwagi na fakt, że transmisja komórki jest funkcją okresową może być przedstawiona jako szereg Fouriera:

$$T(\lambda) = (1 - R)^2 + \sum_{k=1}^{\infty} A_k \sin \left(k \frac{2\pi\lambda}{\Delta_\lambda} + \psi_k \right) \quad (2.1.3.3)$$

gdzie A_k i ψ_k oznaczają odpowiednio amplitudę i fazę k -tej harmonicznej. Z uwagi na fakt, że ich okres wynosi $\Delta_{\lambda k} = \Delta_\lambda/k$ zastosowanie odpowiednio dobranej biegnącej średniej prowadzi do stłumienia drugiej (oscylacyjnej) części równania 2.1.3.3, niezależnie od jej fazy.

Podczas pomiaru stężenia biomarkerów w wydychanym powietrzu za pomocą komórki wieloprzejsiowej natężenie światła docierające do detektora jest równe:

$$\begin{aligned} I(\lambda) &= I_0(\lambda) T(\lambda) \exp[-\sigma(\lambda)NL] = \\ &= I_0(\lambda) \left[(1 - R)^2 + \sum_{k=1}^{\infty} A_k \sin \left(k \frac{2\pi\lambda}{\Delta_\lambda} + \psi_k \right) \right] \exp[-\sigma(\lambda)NL] \end{aligned} \quad (2.1.3.4)$$

gdzie $I_0(\lambda)$ oznacza natężenie przed komórką wieloprześciową, iloczyn $\sigma(\lambda)N$ to współczynnik absorpcji (zgodnie ze wzorem 1.4.2), a L oznacza drogę optyczną. Dla bardzo małych współczynników absorpcji (typowych dla biomarkerów, tj. $\sigma(\lambda)NL \ll 1$) funkcja wykładnicza może być przybliżona wielomianem pierwszego rzędu. Zastosowanie biegnącej średniej do funkcji $I(\lambda)$ oraz założenie, że moc lasera zmienia się bardzo nieznacznie podczas modulacji długości fali w zakresie jednego okresu szumów optycznych ($I_0(\lambda) = \text{const}$), prowadzi do równania:

$$\langle I(\lambda) \rangle \approx \frac{I_0(\lambda)}{D_\lambda} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} \left[(1 - R)^2 + \sum_{k=1}^{\infty} A_k \sin \left(k \frac{2\pi x}{D_\lambda} + \psi_k \right) \right] [1 - \sigma(x)NL] dx \quad (2.1.3.5)$$

Uwzględniając charakterystykę filtru *sinc* (rys. 25) można stwierdzić, że całkowanie po pełnym okresie prążków (lub jego wielokrotności) prowadzi do usunięcia wyrażen:

$$\frac{I_0(\lambda)}{D_\lambda} \sum_{k=1}^{\infty} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} A_k \sin \left(k \frac{2\pi x}{D_\lambda} + \psi_k \right) dx \rightarrow 0 \quad (2.1.3.6)$$

Dodatkowo, wyrażenie:

$$\frac{NL I_0(\lambda)}{D_\lambda} \sum_{k=1}^{\infty} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} \sigma(x) A_k \sin \left(k \frac{2\pi x}{D_\lambda} + \psi_k \right) dx \quad (2.1.3.7)$$

jest zaniedbywalne z uwagi na niewielki współczynnik absorpcji $\propto (\lambda) = \sigma(\lambda)NL$. Ostatecznie, natężenie promieniowania można wyrazić wzorem:

$$\langle I(\lambda) \rangle \approx (1 - R)^2 I_0(\lambda) \left[1 - \frac{NL}{D_\lambda} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} \sigma(x) dx \right] = I_0(1 - R)^2 [1 - NL \langle \sigma(\lambda) \rangle] \quad (2.1.3.8)$$

gdzie

$$\langle \sigma(\lambda) \rangle = \frac{1}{D_\lambda} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} \sigma(x) dx \quad (2.1.3.9)$$

oznacza efektywny przekrój czynny na absorpcję, tj. jego wartość uśrednioną po jednym okresie modulacji szumów optycznych (lub kolejnych wielokrotnościach jego wartości).

Z przedstawionej analizy wynika, że zakres D_λ powinien być odpowiednio dobrany, ponieważ zbyt szerokie uśrednianie sygnału prowadzi do niepotrzebnego spłaszczenia i poszerzenia linii absorpcyjnych. Z tego punktu widzenia optymalne jest użycie modulacji lasera i uśredniania dla $D_\lambda/\Delta_\lambda = 1$. Wybór większego zakresu może być uzasadniony koniecznością redukcji innych zakłóceń (np. białego szumu). Opisana metoda jest niewrażliwa na zmianę fazy szumu optycznego spowodowaną między innymi rozszerzalnością termiczną komórki wieloprześciowej gdy zakres uśredniania jest równy krotności Δ_λ . Dla modulacji poniżej pojedynczego okresu oscylacji ($D_\lambda/\Delta_\lambda < 1$) obserwuje się wzrost wpływu niepożądanych interferencji na sygnał wraz ze spadkiem D_λ (rys. 24).

Opisaną metodę tłumienia niepożądanych interferencji optycznych po raz pierwszy zastosowano w eksperymencie przedstawionym w rozdziale 2.3.6 przy pomiarach formaldehydu. Szczegółowe wyniki opisujące pozytywny wpływ na jego detekcję opisano w publikacji [107].

Wykorzystanie modulacji długości fali było wspomniane już we wcześniejszych publikacjach [¹⁰⁸], choć bez wymieniania sposobu doboru amplitudy modulacji do parametrów komórki wieloprzejściowej.

2.2. Metodyka pomiaru – ogólna

W celu jak najwierniejszej detekcji biomarkerów postanowiono badać powietrze bezpośrednio wydychane z płuc. Jest to metoda trudniejsza od pomiaru z wykorzystaniem powszechnie używanych worków tedlarowych do tymczasowego przechowywania próbek oddechu [¹⁰⁹], ponieważ wymagany jest system pneumatyczny umożliwiający pracę z testowaną osobą. Dodatkowo, nie wykorzystywano żadnych metod osuszania wydychanego gazu. Oba te warunki pozwalają założyć, że koncentracja badanych biomarkerów nie będzie różnić się od tej w płucach badanego. Szczegółowe schematy układu pomiarowego (różne dla różnych biomarkerów) opisane są w rozdziałach poświęconych pomiarom formaldehydu (2.3) i etanu (2.4).

2.3. Detekcja formaldehydu

2.3.1. Zastosowania wykrywania śladowych ilości formaldehydu

Spośród wielu różnych substancji identyfikacja formaldehydu (H_2CO) jest istotna w wielu dziedzinach. Gaz ten jest powszechnie obecny, toksyczny i prawdopodobnie rakotwórczy, a ponadto często stosowany w przemyśle chemicznym. Wykorzystywany jest także do produkcji materiałów gospodarstwa domowego (meble, kleje i farby). Jego emisja z tych produktów, jak również w procesie ich produkcji może wpływać na zdrowie, powodować podrażnienie oczu, nosa i gardła prowadzące do kichania i kaszlu oraz powodować ogólny dyskomfort [^{110, 111, 112, 113, 114, 115}]. Przyczynia się również do „syndromu chorego budynku” (ang. *sick building syndrome* [^{116, 117}]). Liczba pacjentów uczulonych na formaldehyd rośnie w wielu uprzemysłowionych rejonach, gdzie występuje problem zanieczyszczenia powietrza [^{118, 119, 120}].

Stężenie formaldehydu w środowisku miejskim waha się zazwyczaj od około 2 do 45 ppb, a jego źródłem jest głównie z przemysł oraz emisja z pojazdów spalinowych. Wtórny źródłem tego gazu jest fotochemiczne utlenianie lotnych związków organicznych w intensywnym świetle słonecznym [¹²¹]. Typowe stężenia we wnętrzach wynoszą 10-80 ppb, jednak w przypadku silnego zanieczyszczenia mogą osiągnąć 80-300 ppb. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) ustaliła dopuszczalny 30-minutowy limit ekspozycji człowieka na 80 ppb [¹²²]. Według *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) stężenie formaldehydu nie powinno w żadnym momencie przekraczać 300 ppb. Z kolei w troposferze monitorowanie H_2CO z rozdzielczością rzędu ułamka ppb jest istotne dla zrozumienia jego roli w bilansie ozonu [¹²³]. Poszukuje się zatem możliwie czułych detektorów formaldehydu pracujących z rozdzielczością czasową rzędu minuty do monitorowania środowisk przemysłowych, a także do testowania jakości powietrza w pomieszczeniach zamkniętych, w miastach i w swobodnej atmosferze na różnych wysokościach.

Formaldehyd został również zidentyfikowany jako potencjalny biomarker raka płuc i piersi występujący w powietrzu wydychanym [^{124, 125, 126, 127, 128, 129}]. Czuła, szybka i niezawodna detekcja tego gazu w badaniach ludzkiego oddechu może stanowić obiecującą

metodę nieinwazyjnej diagnostyki tych chorób w czasie rzeczywistym oraz monitorowania stanu pacjenta. Może również być stosowana do przesiewowych testów w kierunku nowotworu pierwotnego lub przerzutowego. Poziom chorobowy stężenia formaldehydu nie został jeszcze dobrze ustalony w badaniach klinicznych. Według nielicznych źródeł, w powietrzu wydychanym przez pacjentów z rakiem piersi obserwowano stężenie H_2CO w zakresie 0,45–1,2 ppm, natomiast 0,3–0,6 ppm [¹³⁰, ¹³¹] u osób zdrowych. W porównaniu z innymi pracami [¹²⁶, ¹²⁷, ¹³²] wydaje się, że dane te albo są znacznie przesadzone, albo wręcz błędne. Niestety badań jest niewiele, brak jest również odpowiedniej statystyki medycznej.

Ze względu na poczynione już na samym początku prac nad doktoratem założenia widać, że możliwe jest wykorzystanie wykonanych w trakcie ich trwania urządzeń wykorzystujących spektroskopię laserową do detekcji formaldehydu w wydychanym powietrzu. Byłyby one używane do przesiewowych badań klinicznych.

Obecnie w celu ilościowego określenia stężenia formaldehydu w powietrzu stosuje się różne metody chemiczne i fizyczne. Chromatografia cieczowa [¹³³, ¹³⁴], chromatografia gazowa [⁷, ¹³⁵, ¹³⁶] i chromatografia jonowa [¹³⁷] mogą zapewnić czułość detekcji nawet rzędu ułamków ppb. Niestety, duża waga i rozmiar takiego sprzętu oraz długi czas pomiaru są negatywnymi aspektami tych technik. Są one również drogie i wymagają wykwalifikowanego personelu. Nie są one dobrym wyborem w przypadku koncentracji formaldehydu rzędu pojedynczych ppb, z uwagi na tworzenie się i osadzanie na ściankach aparatury polimeru tego związku [¹³⁸]. Półprzewodnikowe czujniki wykorzystujące folie wrażliwe na gaz, nadają się do monitorowania formaldehydu ze względu na krótki czas reakcji [¹³⁹, ¹⁴⁰, ¹⁴¹], jednak ich niewielka selektywność i stosunkowo niska czułość (>250 ppb) są istotnymi ograniczeniami. Elektrochemiczne czujniki H_2CO mają dobrą czułość i selektywność, ale charakteryzują się kiepską stabilnością, a w dodatku z czasem odpowiedzi wynoszącym około jednej godziny [¹⁴², ¹⁴³]. Kolorymetryczne analizatory chemiczne, które wykorzystują barwienie odczynników wrażliwych na formaldehyd, mają czułość rzędu pojedynczych ppb, ale ich wyniki mogą być zakłócane przez inne związki organiczne. Dodatkowo, używane w nich odczynniki chemiczne są jednorazowe i zachodzi konieczność ich wymiany.

W związku z opisanymi powyżej niedoskonałościami różnych technik pomiarowych dobrze rokującym wyborem wydaje się pomiar metodami optycznymi. Z uwagi na duży postęp, który nastąpił w optoelektronice i spektroskopii laserowej obecnie możliwe jest skonstruowanie przenośnego urządzenia o precyzji rzędu kilku ppb³. Nie wymagałoby ono ani wysoko wykwalifikowanego personelu do jego obsługi, ani uzupełniania odczynników, a koszt, w przypadku produkcji seryjnej, umożliwiłaby jego upowszechnienie. Niewielki koszt badań i krótki czas pojedynczego pomiaru, wynoszący kilka minut, pozwalałby na wykonywanie badań przesiewowych.

³ W literaturze [¹⁴⁸] pojawiają się doniesienia o metodach optycznych o czułości rzędu pojedynczych ppb lub lepszej, jednak zazwyczaj dotyczy to próbki przygotowanej w czystym azocie lub argonie, bez obecności interferentów (zwłaszcza w stężeniu oddechowym). Dodatkowo, brak jest eksperymentów potwierdzających pomiary tak niskiej koncentracji – są one jedynie wynikiem ekstrapolacji danych pomiarowych na podstawie stosunku sygnału do szumu.

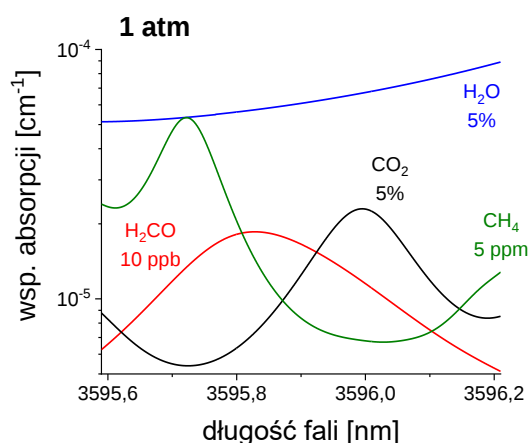
2.3.2. Przegląd osiągnięć w optycznym wykrywaniu śladowych ilości formaldehydu

Spośród metod optycznych detekcji wykorzystywano m.in.: spektroskopię fluorescencyjną [¹⁴⁴,¹⁴⁵,¹⁴⁶], spektroskopię fotoakustyczną [¹⁴⁷], spektroskopię strat we wnętrzu optycznej (CRDS) w paśmie 5,6 μm [¹⁴⁸] oraz metodę wieloprzejęciową wraz z modulacją długości fali [¹⁴⁹]. Ostatnia z cytowanych prac jest najbliższa podejściu, które opisano w niniejszej rozprawie, przy czym zasadniczą różnicą jest fakt, że jej autorzy nie brali pod uwagę interferentów występujących w powietrzu wydychanym bezpośrednio z płuc, co miało istotny wpływ na założenia (m.in. długość fali oraz ciśnienie) pomiaru.

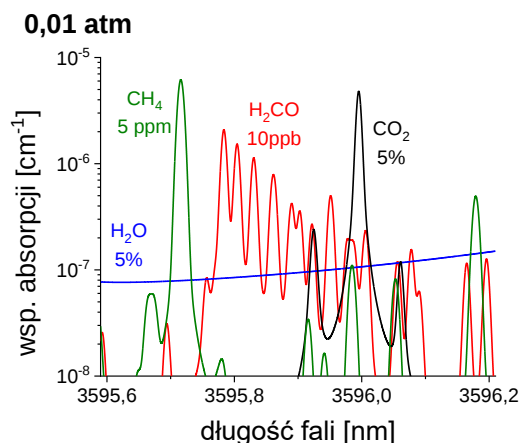
W pracy [¹⁴⁹] widoczne są pewne nieścisłości, mianowicie czułość metody określona jest jako 6 ppb dla czasu akwizycji jednej sekundy oraz 1,5 ppb dla 140 sekund. Nie zostało to jednak w żaden sposób potwierdzone eksperymentalnie gdyż pomiary prowadzono w zakresie koncentracji gazu od 26,8 do 250 ppb. Czułości te są jedynie ekstrapolowane na podstawie wykresu wariancji Allana wyznaczonego dla stężenia 100 ppb. Brak rozróżnienia między czułością, a dokładnością pomiaru, jak również brak wyraźnego rozgraniczenia eksperymentu z ekstrapolacją może wprowadzać czytelnika w błąd. Jest to istotne w przypadku takich substancji jak formaldehyd, który jest silnie adsorbowany (a następnie uwalniany) na ściankach aparatury pomiarowej. Problem ten, opisany w dalszej części pracy, jest szczególnie dotkliwy przy pomiarach małych koncentracji tego gazu przy obniżonym ciśnieniu.

2.3.3. Wybór optymalnej linii absorpcyjnej do wykrywania formaldehydu

Jak wspomniano w rozdziale 1.7.2 formaldehyd posiada dwa pasma absorpcyjne w zakresie 1 – 8 μm . Pasma spektralne 5,7 μm jest nieużyteczne w badaniu oddechu, z uwagi na silną absorpcję światła podczerwonego o tej długości fali przez parę wodną, której stężenie w płucach może osiągnąć nawet 5%. Co więcej, w tym zakresie długości fal konieczne jest użycie specjalnych materiałów optycznych, co dodatkowo komplikuje eksperyment. Krótsze pasmo absorpcyjne – 3,5 μm – jest często stosowane do optycznej detekcji tego związku [¹⁵⁰,¹⁵¹,¹⁵²,¹⁵³,¹⁵⁴,¹⁵⁵,¹⁵⁶,¹⁵⁷].



Rysunek 26: Widmo formaldehydu i interferentów oddechowych - 1 atm.



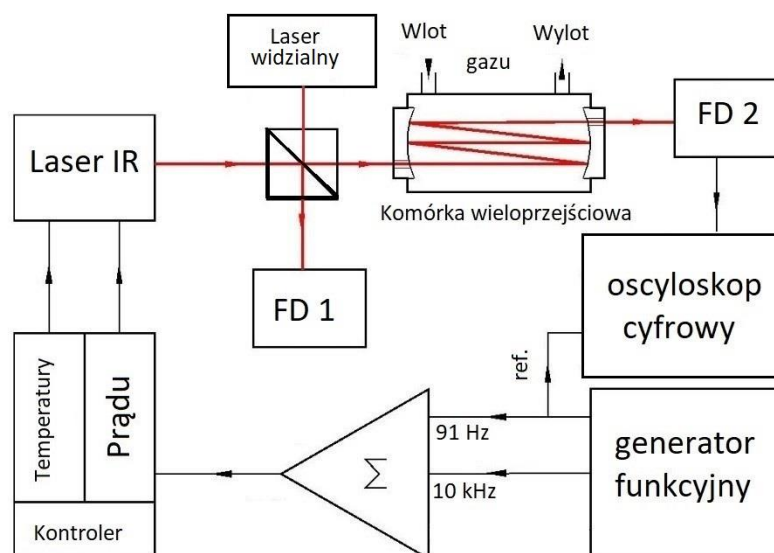
Rysunek 27: Widmo formaldehydu i interferentów oddechowych - 0,01 atm.

Wykorzystanie bazy danych HITRAN i autorskiego programu do analizy widm związków występujących w oddechu wykazało, że najmniejszy wpływ interferentów występuje w zakresie 3595,6 – 3596,2 nm. Jednak te linie formaldehydu (przy stężeniu 10 ppb, zbliżonym do założonej czułości detekcji) nadal są zakłócone przez silną absorpcję wody, dwutlenku węgla i metanu (rys. 26). W związku z tym optyczne wykrywanie tego związku z odpowiednią czułością jest niemożliwe przy ciśnieniu atmosferycznym. Obniżając ciśnienie badanej próbki można skutecznie rozseparować ich widma⁴. Na rys. 27 zaprezentowane są linie formaldehydu, wody, dwutlenku węgla i metanu w tym samym zakresie długości fali, ale pod ciśnieniem 0,01 atm. Ich zawężenie spowodowało separację widm interferentów i biomarkera. Względna wartość tła zmniejszyła się o ponad dwa rzędy wielkości. Niestety, metoda ta prowadzi do zmniejszenia liczby absorbujących cząsteczek w próbce, a co za tym idzie obniża się współczynnik absorpcji (i wobec tego czułość pomiaru), co zostało opisane w rozdziale 1.8.

2.3.4. Układ pomiarowy

Schemat układu pomiarowego pokazano na rys. 28. Jako źródło promieniowania wykorzystano jednomodowy półprzewodnikowy laser typu ICL (*interband cascade laser*) firmy Nanoplus. Jego promieniowanie padało na płytkę światłodzielącą, która odbijała część wiązki lasera do detektora FD1 znajdującego się przed komórką wieloprzejsiową. Pozwalało to na monitorowanie mocy lasera. Rolę beamsplittera pełniła płytka wykonana z szafiru (Thorlabs WW30530) o przekroju klinowatym, dzięki czemu uniknięto nakładania się odbitych w jej wnętrzu wiązek światła.

⁴ Jak opisano w rozdziale 1.6, poszerzenie zderzeniowe, które jest odpowiedzialne za szerokość linii absorpcyjnych gazów w tych warunkach, maleje wraz z ciśnieniem.



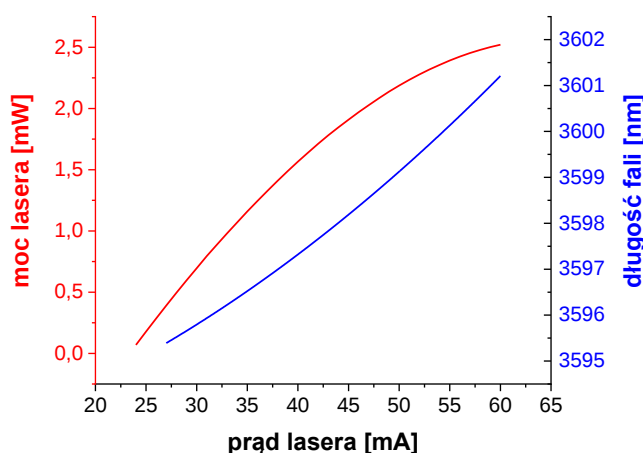
Rysunek 28: Schemat układu pomiarowego do wykrywania formaldehydu.

Dodatkowo, obecność tej płytki umożliwiała zastosowanie pomocniczego lasera pracującego w świetle widzialnym i skolimowanie go z wiązką podczerwoną. Użyto lasera czerwonego, o długości fali 625 nm. Dzięki uwidocznieniu wiązki możliwe było zjustowanie układu optycznego, a w szczególności komórki wieloprześciowej. Laser widzialny pełnił funkcję pomocniczą jedynie podczas strojenia układu i był wyłączany podczas pomiarów.

Po przejściu przez płytkę światłodzielną wiązka lasera kierowana była do komórki wieloprześciowej, a na jej wyjściu rejestrowano ją za pomocą fotodetektora FD2 i oscyloskopu cyfrowego (Tektronix DPO7104)

Jako mierników natężenia promieniowania podczerwonego użyto detektorów firmy Thorlabs (PDA20H). Element światłoczuły wykonany był z selenku ołowiu, miał wymiary 2x2 mm i umożliwiał pracę z długością fali od 1500 do 4800 nm. Model ten wyposażony był we wzmacniacz elektroniczny o sprzężeniu zmiennoprądowym i paśmie przenoszenia od 0,1 Hz do 10 kHz. Fotodetektor nie był chłodzony.

Długość fali lasera była strojona w sposób zgrubny za pomocą kontrolera temperatury (Toptica DTC-110). Do strojenia precyzyjnego z dokładnością pojedynczych pikometrów służył kontroler jego prądu zasilania (Toptica DCC-110) sterowany z dwukanałowego generatora funkcyjnego (Tektronix AFG3102). Sygnał sinusoidalny 91 Hz modulował długość fali lasera w zakresie widmie absorpcji formaldehydu. Amplitudę tego sygnału dobrano tak, by modulacja obejmowała cztery linie absorpcyjne, od 3595,77 do 3596,20 nm (rys. 27). Podstawa czasu oscyloskopu cyfrowego wyzwalana była za pomocą wymienionego powyżej generatora. Modulacja sinusoidalna o częstotliwości 10 kHz służyła do redukcji szumów optycznych, przy pomocy metody opisanej w rozdziale 2.1.3. Oba sygnały były sumowane we wzmacniaczu sumującym, którego sygnał kierowano do kontrolera prądu lasera.



Rysunek 29: Charakterystyki prąd – moc i prąd – długość fali lasera do detekcji formaldehydu w temperaturze 15°C.

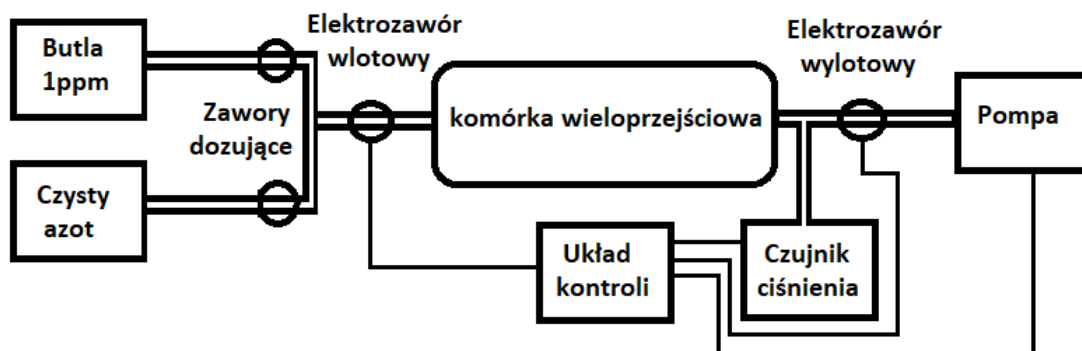
Jak wiadomo, przestrajanie lasera półprzewodnikowego za pomocą modulacji prądu powoduje jednocześnie zmiany jego mocy (rys. 29). Warto zauważyć, że zależność prąd – moc jest nieliniowa. Opracowanie zebranych podczas eksperymentu danych wymagało więc usunięcia tła spowodowanego modulacją mocy lasera. W tym celu do sygnału zarejestrowanego za pomocą oscyloskopu dopasowywano wielomian drugiego stopnia, który następnie odejmowano od zebranego sygnału, natomiast szum usuwano filtrem dolnoprzepustowym czwartego rzędu o paśmie 250 Hz. Pozwoliło to odtwarzać charakterystyczne widmo formaldehydu. Wyodrębniano fragment między pierwszym a czwartym minimum absorpcji formaldehydu pod ciśnieniem 0,01 atm. (rys 27). Tak przygotowane dane były następnie całkowane. W celu określenia stężenia H_2CO wynik tej operacji porównywano z rezultatem zarejestrowanym w identyczny sposób dla wzorcowej mieszaniny formaldehydu z azotem z butli wzorcowej (1 ± 0.05 ppm).

2.3.5. Układ próżniowy

Testowanie układów pomiarowych wymagało przygotowania próbek badanych gazów o koncentracjach rzędu pojedynczych cząstek na miliard – ppb. Probki etanu i formaldehydu w azocie dostępne w handlu w butlach (przygotowane na specjalne zamówienie przez firmę Messer) charakteryzowały się stężeniem o trzy rzędy większym (1 ppm). Niższe koncentracje nie były możliwe do nabycia. W związku z tym konieczne było przygotowanie pomocniczego systemu, umożliwiającego rozrzedzanie tych gazów. Dodatkowo, wykorzystano je do sprawdzenia liniowości badanego urządzenia.

W tym celu wyżej wymienioną wzorcową butlę z gazem podłączano za pośrednictwem elektrozaworu do układu próżniowego (rys. 30). Podobnie podłączono źródło czystego azotu, uzyskiwanego z odparowania jego fazy ciekłej. Do regulacji ciśnienia w komórce wieloprześciowej służyły bezolejowa pompa próżniowa i elektrozawór wylotowy. Jako elektroniczny miernik ciśnienia w komórce użyty został baratron 722B (firmy MKS). W celu sterowania zaworami wykorzystano układ

elektroniczny oparty o mikrokontroler. Umożliwiło to wyeliminowanie sterowania ręcznego i uzyskania możliwie dużej powtarzalności pomiarów.

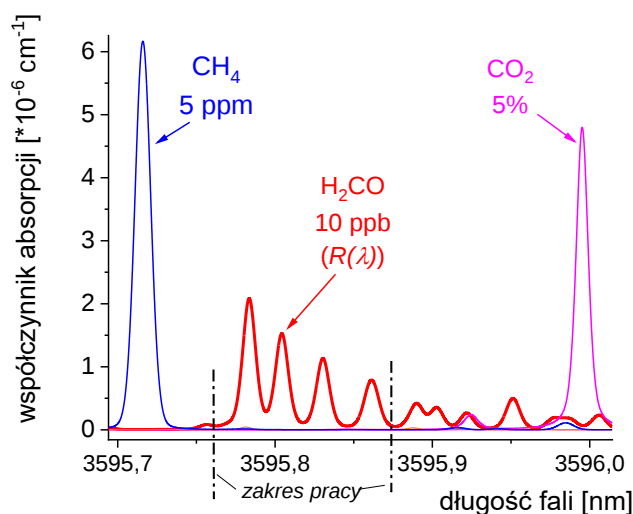


Rysunek 30: Schemat układu próżniowego.

Procedura rozrzedzania mieszanki miała następujący przebieg: początkowo (numer kroku $k = 0$) komórkę napełniano wzorcową mieszkanką (formaldehydu lub etanu) do standardowego ciśnienia pomiarowego. Po zrealizowaniu pomiarów optycznych dodawano azotu tak, aby ciśnienie w komórce wzrosło dwukrotnie. Po około 15 minutach, niezbędnych do uzyskania dobrego wymieszania gazów, ciśnienie ponownie obniżano do wartości pomiarowej ($k = 1$) i dokonywano kolejnej rejestracji sygnałów optycznych. Operację tę powtarzano wielokrotnie (k - razy). Wyniki uzyskane w wskutek stosowania tej procedury dla formaldehydu przedstawiono w rozdz. 2.3.8, a dla etanu 2.4.6.

2.3.6. Redukcja szumów optycznych – eksperyment

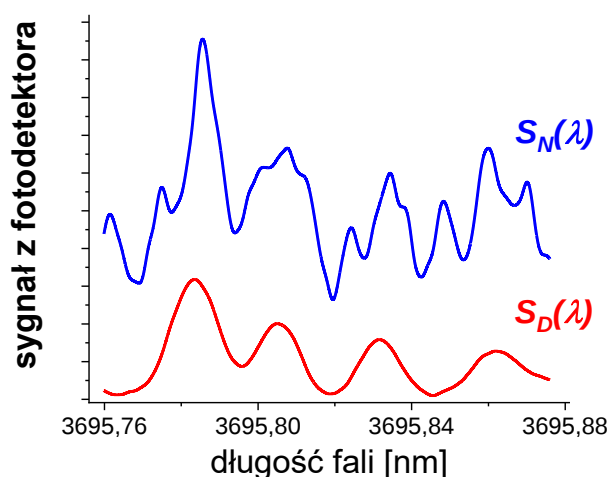
Metodę tłumienia szumów optycznych przetestowano w eksperymencie symulującym wykrywanie formaldehydu w powietrzu. Pomiary wykonano w zakresie widmowym odpowiadającym pasmu absorpcji w pobliżu 3595,8 nm pod ciśnieniem 0,01 atmosfery. Charakterystyczne linie absorpcyjne formaldehydu widoczne są na rys. 31.



Rysunek 31: Linie absorpcyjne formaldehydu i interferentów w okolicy 3595,8 nm.

Zgodnie z opisem z poprzednich rozdziałów w eksperymencie zastosowano dwuczęstotliwościową modulację prądu lasera. Pierwsza została wykonana sygnałem sinusoidalnym o częstotliwości równej 91 Hz o amplitudzie pozwalającej na skanowanie długości fali lasera w zakresie 3595,767 – 3595,876 nm, czyli w zakresie oznaczonym na rysunku 31 zawierającym cztery linie absorpcyjne. Drugi sygnał modulujący (sinusoidalny, 10 kHz) wykorzystano do tłumienia niepożądanych szumów optycznych. Jego amplituda została dobrana ręcznie, dążąc do jak najlepszego zminimalizowania zakłóceń obserwowanych na ekranie oscyloskopu. Oba sygnały zostały połączone we wzmacniaczu sumującym. Jego sygnał wyjściowy został wykorzystany do sterowania prądem lasera.

Rys. 32 przedstawia zarejestrowane widma absorpcyjne dla 1 ppm formaldehydu pod ciśnieniem 0,01 atm. Niebieska linia ($S_N(\lambda)$) to widmo zapisane bez dodatkowej modulacji 10 kHz, czyli bez tłumienia szumów optycznych. Niepożądane oscylacje nakładające się na linie formaldehydu są wyraźnie widoczne pomimo relatywnie dużej (100 razy wyższej niż zakładana czułość urządzenia) koncentracji tego gazu w próbce. Czerwony przebieg ($S_D(\lambda)$) odpowiada sygnałowi zebranemu w tych samych warunkach, ale w przypadku włączenia modulacji tłumiącej szumy optyczne. Porównując ten przebieg z widmem na rys. 31, wyraźnie widoczne są wszystkie cztery linie absorpcyjne znajdujące się w zakresie pracy lasera.



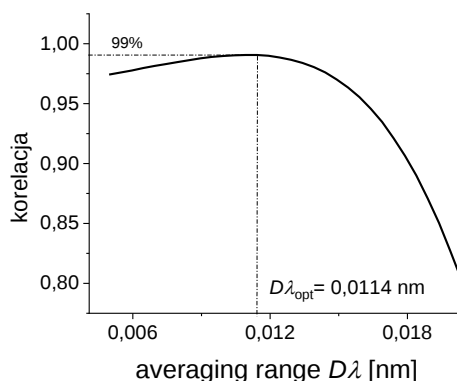
Rysunek 32: Tłumienie zakłóceń optycznych – eksperyment.

Uśrednianie sygnału w dziedzinie długości fali prowadzi do poszerzenia i spłaszczenia linii widmowej, co wykazano w rozdziale 2.1.3 (wzór 2.1.3.8). Powoduje to zmniejszenie jej amplitudy w stosunku do widma absorpcyjnego danej molekuly o pewien współczynnik (κ). W celu wyznaczenia tego współczynnika zastosowano procedurę uśredniania wzorcowego widma formaldehydu $R(\lambda)$ (pochodzącego z bazy HITRAN) z różnymi przedziałami D_λ :

$$\langle R(\lambda, D_\lambda) \rangle = \frac{1}{D_\lambda} \int_{\lambda - \frac{D_\lambda}{2}}^{\lambda + \frac{D_\lambda}{2}} R(x) dx \quad (2.3.6.1)$$

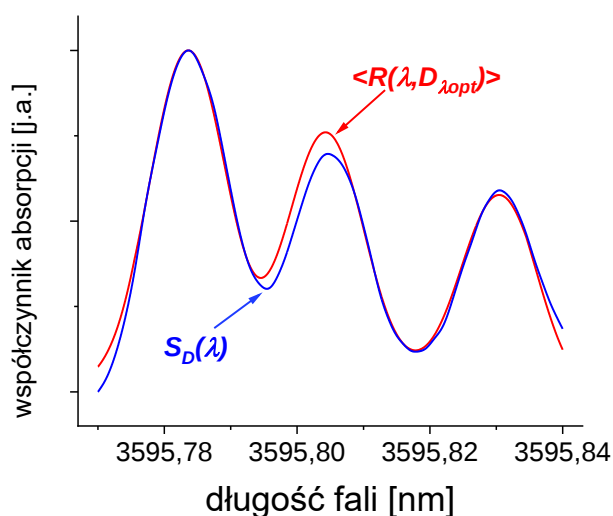
Każdorazowo obliczano współczynnik korelacji pomiędzy $\langle R(\lambda, D_\lambda) \rangle$ a widmem eksperymentalnym $S_D(\lambda)$, jako iloraz kowariancji i iloczynu ich odchyleń standardowych. Wyniki tej analizy przedstawiono na rys. 33. Najwyższy współczynnik korelacji (99%)

uzyskano dla zakresu uśredniania $D_{\lambda opt} = 0,0114$ nm. Uśrednienie widma formaldehydu po przedziale $D_{\lambda opt}$ doprowadziło do zmniejszenia jego amplitudy (spłaszczenia) o współczynnik $\kappa = 1,32$.



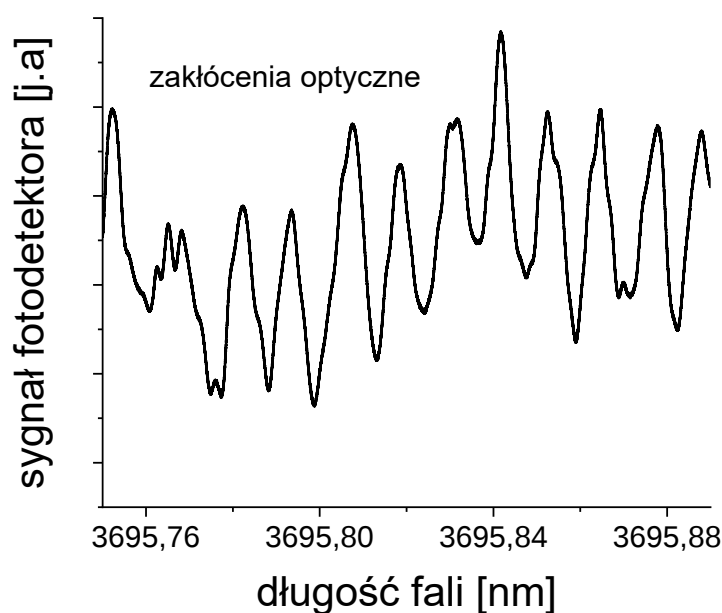
Rysunek 33: Zależność współczynnika korelacji od szerokości przedziału uśredniania.

Korekta spłaszczenia jest istotna w przypadku pomiaru stężenia badanego związku poprzez porównanie amplitud zarejestrowanego widma i widma wzorcowego (rys. 34). Opisana procedura daje możliwość znalezienia współczynnika κ , nawet wtedy, gdy zakres D_λ nie jest dokładnie znany, ponieważ został ustawiony arbitralnie za pomocą generatora.



Rysunek 34: Porównanie uśrednionego widma wzorcowego $\langle R(\lambda, D_{\lambda opt}) \rangle$ i widma $S_D(\lambda)$ zarejestrowanego doświadczalnie.

W celu doświadczalnej obserwacji samych szumów optycznych komórkę wieloprześciową odpompowano do ciśnienia końcowego 10^{-5} atm. W związku z tym, reszkowe stężenie formaldehydu zmniejszyło się około 1000 razy i można założyć, że sygnał transmitowany przez komórkę odpowiadał jedynie szumom optycznym. Wynik pomiaru pokazano na rys. 35 (czarna linia). Średni okres (w dziedzinie długości fali) oscylacji wynosi $\Delta\lambda = 0,0117$ nm. Pokrywa się to dobrze z optymalną wartością zakresu uśredniania $D_{\lambda opt} = 0,0114$ nm, która została znaleziona w poprzednim doświadczeniu.

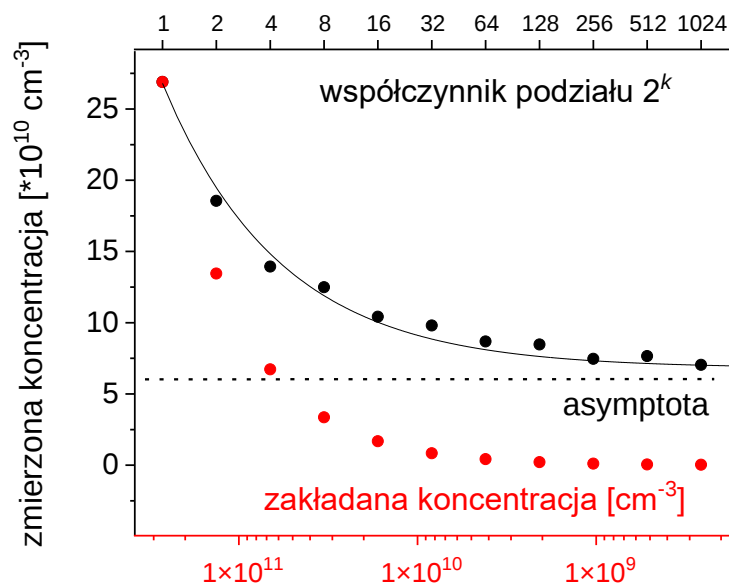


Rysunek 35: Zakłócenia optyczne zarejestrowane w komórce wieloprzejsiowej.

2.3.7. Polimeryzacja i depolimeryzacja formaldehydu w aparaturze badawczej

Sprawdzenie opisanej metody pomiarowej dla różnych stężeń H_2CO wymagało przygotowania mieszanek o różnych koncentracjach. Dysponowano jedynie butlą z mieszaną tego związku z azotem o wzorcowym stężeniu 1 ppm. Dokonywano więc krok po kroku rozcieńczania mieszanek czystym azotem posługując się aparaturą próżniową i procedurą opisanymi w rozdziale 2.3.5. Spodziewano się uzyskać w wyniku k kolejnych kroków 2^k -krotny podział stężenia H_2CO , aż do osiągnięcia granicy czułości optycznego pomiaru koncentracji tego związku.

Wyniki tego eksperymentu przedstawiono na rys. 36. Widać wyraźnie, że nie udało się uzyskać równych podziałów stężenia o czynnik 2. Otrzymano koncentrację około $6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ po 10 krokach, wychodząc od początkowego stężenia formaldehydu około $2,7 \cdot 10^{11} \text{ cm}^{-3}$ (1 ppm pod ciśnieniem 0,01 atm).



Rysunek 36: Pomiar koncentracji formaldehydu w kolejnych krokach podziału stężenia przez 2.

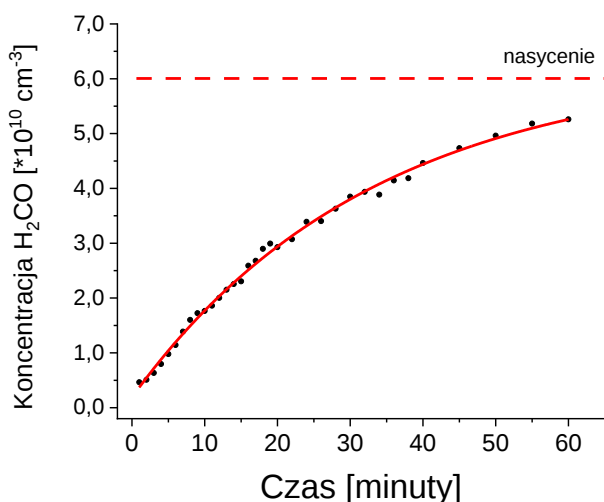
Za efekt ten odpowiada osadzanie się formaldehydu w urządzeniu pomiarowym. Związek ten przylega do ścianek komórki wieloprzejściowej w postaci polimeru – polioksymetyleny [158]. Polimer, który został osadzony na ściankach przy wyższych stężeniach formaldehydu, odparowuje przy koncentracjach niższych, dostarczając fazy gazowej. Eksperyment wykazał, że osiągnięcie stężenia poniżej wartości asymptotycznej $6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$ w wyniku kolejnych podziałów nie było możliwe.

Zanieczyszczenie czujników formaldehydu polioksymetylenem jest istotnym (choć nieporuszonym w publikacjach innych autorów) problemem przy pomiarach stężeń H_2CO na poziomie ppb. W szczególności przy niskich ciśnieniach nawet mała emisja ze ścianek silnie zaburza wynik (co pokazano w następnym doświadczeniu na rys. 37). Oczyszczenie urządzenia z polimeru można przeprowadzić poprzez podgrzanie do temperatury około 200°C , jednak w przypadku omawianych układów optycznych jest to niemożliwe. Stosowanie niższych temperatur, które są akceptowalne dla komórki wieloprzejściowej nie przynosi pożądanego efektu. Stwierdziliśmy, że ogrzewanie jej do około 70°C wraz z utrzymywaniem próżni (około 10^{-5} atm) lub przedmuchiwanie komórki czystym azotem nie prowadzi do istotnej poprawy nawet po kilku dniach.

Innym sposobem czyszczenia układu jest wykorzystanie reakcji Mannicha [159]. Wymaga to wprowadzenia do komórki par amoniaku pod ciśnieniem atmosferycznym. Jakkolwiek w warunkach laboratoryjnych sposób ten okazał się skuteczny, trudno wyobrazić sobie stosowanie go w praktyce. Dodatkowo, nie rozwiązuje to problemów zarówno adsorpcji, jak i desorpcji biomarkera w trakcie pomiaru, która może istotnie zmieniać stężenie i wpływać na wynik badania.

2.3.8. Wyniki pomiarów

Efekt emisji gazowego formaldehydu z osadzonego polimeru postanowiono wykorzystać do przetestowania niniejszego detektora przy niskich (rzędu ppb) stężeniach formaldehydu. Doświadczenie przeprowadzono w temperaturze pokojowej (ok. 21 °C). Zanieczyszczoną polioksymetylenem komórkę odpompowano do ciśnienia resztkowego 10^{-7} atm, i bezpośrednio po tym napełniono czystym azotem do ciśnienia 0,01 atm. Zgodnie z przewidywaniami, zaobserwowano odparowanie polimeru ze ścianek aparatury, co powodowało jej powolne napełnianie formaldehydem. Rejestrację jego stężenia prowadzono za pomocą układu laserowego, początkowo co minutę, następnie rzadziej. Wyniki kolejnych pomiarów przedstawiono na rys. 37.



Rysunek 37: Pomiar koncentracji formaldehydu - emisja ze ścianek.

Na podstawie tego wyniku opracowano prosty model osadzania się polimeru formaldehydu na ścianach urządzenia i jego parowania. W podejściu tym liczba cząsteczek odparowujących w jednostce czasu jest stała i równa ξ , natomiast proces odwrotny, czyli liczba cząsteczek przylegających do powierzchni aparatury, jest proporcjonalna do stężenia par H_2CO (N) i stałej osadzania Υ . Ewolucja stężenia par formaldehydu w czasie jest w związku z tym opisana za pomocą równania różniczkowego:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\Upsilon N(t) + \xi, \quad (2.3.8.1)$$

którego rozwiązaniem jest

$$N(t) = \frac{\xi}{\Upsilon} [1 - \exp(-\Upsilon t)]. \quad (2.3.8.2)$$

Funkcja ta dobrze pasuje do zebranych danych eksperymentalnych (ciągła czerwona linia na rys. 37). Na podstawie dopasowania można było wyznaczyć wartości: stałej osadzania $\Upsilon \approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, szybkości parowania $\xi \approx 3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-3}\text{s}^{-1}$ oraz stężenia nasycenia: $\xi/\Upsilon \approx 6 \cdot 10^{10} \text{ cm}^{-3}$. Należy zauważyć, że jego wartość jest zbliżona do stężenia asymptotycznego uzyskanego w poprzednim eksperymencie (rys. 36).

Dodatkowo, z równania 2.3.6.2 można obliczyć, że stężenie formaldehydu w komórce wieloprzejściowej w ciągu pierwszej minuty doświadczenia narosło do około

$1,8 \cdot 10^9 \text{ cm}^{-3}$. Odpowiada to koncentracji ok. 6,6 ppb formaldehydu w azocie. Jest to minimalna wartość stężenia tego biomarkera, jaką udało się zmierzyć w eksperymencie. Taka koncentracja wynika przede wszystkim z faktu, że czas pomiaru wynosił ok. jednej minuty. Należy pamiętać, że stężenie formaldehydu narastało najszybciej na początku eksperymentu. Można zatem wyciągnąć wniosek, że jeśli czas uśredniania trwa jedną minutę, to dokładność każdego kolejnego pomiaru jest nie gorsza niż 6,6 ppb.

Różne inne podejścia – takie jak próby oczyszczenia komórki przy pomocy reakcji Mannicha, a następnie wypełnienie jej odpowiednio małą porcją formaldehydu nie powiodły się, ponieważ stężenie tego gazu w próbce szybko zmniejszało się w czasie wskutek osadzania na ściankach przyrządu. Można przypuszczać, że granica wykrywalności zbudowanego czujnika była znacznie niższa⁵ – mimo to osiągnięty rezultat wydaje się wystarczający do badań powietrza wydychanego z płuc [160].

Wybór odpowiedniej linii absorpcyjnej, zastosowanie samodzielnie wykonanej komórki wieloprześciowej o drodze optycznej kilkunastu metrów, a także wykorzystanie autorskiej metody tłumienia zakłóceń optycznych pozwoliło na osiągnięcie wysokiej czułości detekcji biomarkera jakim jest formaldehyd. Dodatkowo, obniżenie ciśnienia gazu do 0,01 atm daje pewność, że pomiar nie będzie zakłócony przez interferenty występujące w oddechu. Nieprzewidziane wcześniej okoliczności, takie jak podatność formaldehydu do tworzenia polimeru osadzającego się na ściankach urządzenia wymusiły zmiany w pierwotnie zakładanej koncepcji pomiaru. Mimo tych trudności udało się osiągnąć w pełni zadowalające rezultaty.

⁵ Teoretyczna czułość przyrządu, z pominięciem efektu osadzania polioksymetyleny.

2.4. Detekcja etanu

Pod kątem diagnostyki medycznej detekcja etanu (C_2H_6) w wydychanym powietrzu jest równie interesująca jak formaldehydu. Ten bezbarwny, bezwonny gaz, jest biomarkerem stanu zapalnego w organizmie. Może być również wykorzystywany jako wskaźnik niedoboru witaminy E [161], a także do identyfikacji przewlekłych chorób układu oddechowego [162], stresu oksydacyjnego [163], twardziny [164] i mukowiscydozy [165, 166]. Ponadto wydychany etan jest wskaźnikiem peroksydacji lipidów w śródmiąższowych chorobach płuc [167, 168, 169], schizofrenii [170, 171, 172], cukrzycy i astmie [173], a także nowotworach płuc [174]. Co więcej, ponieważ stężenie etanu w oddechu zmienia się w trakcie sesji hemodializy, może być wykorzystane do monitorowania tego procesu [175].

Badania kliniczne z udziałem etanu prowadzono do tej pory przede wszystkim z wykorzystaniem chromatografii gazowej. Jak już wspomniano w rozdziale 1.3 nie nadaje się ona do testów przesiewowych. Jednak z jej użyciem wykazano, że stężenie C_2H_6 w zdrowym ludzkim oddechu wynosi około 0,12 ppb, podczas gdy w stanie chorobowym może osiągnąć kilka ppb [176]. Chociaż ostatnio opracowano ulepszone chromatografy gazowe [177], pełen potencjał wykrywania etanu w diagnostyce medycznej nie został wykorzystany przez brak metody pomiarowej czasu rzeczywistego o wystarczającej czułości. Do tego celu obiecującymi wydają się być podejścia optyczne.

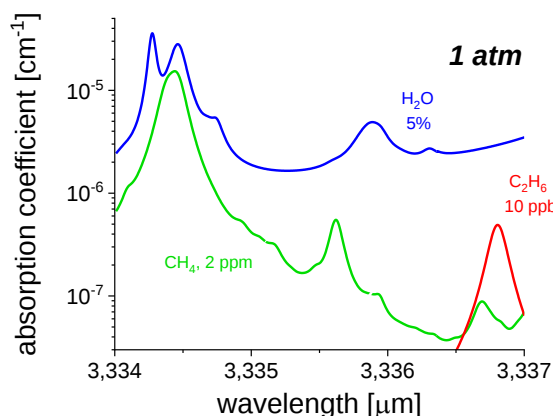
2.4.1. Przegląd osiągnięć w wykrywaniu śladowych ilości etanu

Publikacji dotyczących wykrywania etanu jest mniej niż formaldehydu. Podobnie jak w przypadku H_2CO , dla C_2H_6 dominującą techniką była chromatografia. Celem jego wykrywania w większości przypadków była diagnostyka medyczna. Metody optyczne [174, 178, 179, 180, 181, 182] wykorzystywano przede wszystkim ze względu na prostotę i szybkość detekcji. Uzyskiwano jednak czułości detekcji gorsze niż w chromatografii, ale układy optyczne mogły służyć do wykrywania etanu w czasie rzeczywistym. Detekcję przeprowadza się przede wszystkim w podczerwieni, w paśmie 3,3 μm . W większości przypadków system laserowy był znacznie bardziej skomplikowany, większy i droższy od opisanego w tej pracy, gdyż – ze względu na brak w tamtym czasie laserów ICL – promieniowanie w wymienionym zakresie wytwarzano metodą mieszania częstotliwości.

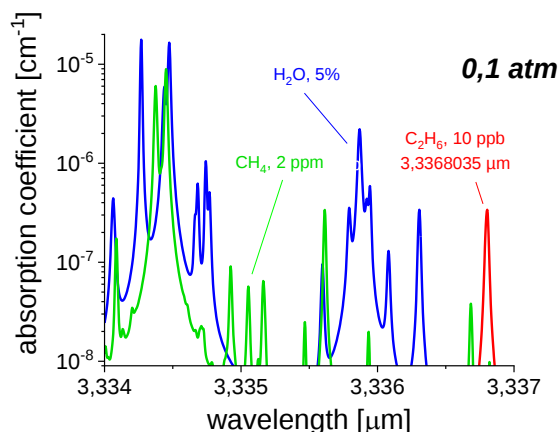
2.4.2. Wybór optymalnej linii absorpcyjnej do wykrywania śladowych ilości etanu

Na podstawie analizy komputerowej, opisanej szczegółowo w rozdziale 1.8, wybrana została linia absorpcyjna o długości fali 3336,80 nm – jako optymalna do detekcji tego związku. Przede wszystkim z uwagi na fakt, że jest ona najmniej zakłócona interferentami obecnymi w oddechu. Para wodna, metan oraz formaldehyd stanowią główne związki, których widma mogą nakładać się na linię etanu. Pod ciśnieniem atmosferycznym – z uwagi na poszerzenie zderzeniowe – ich szerokie widma utrudniają detekcję (rys. 38). Analiza wykazała, że do wykrywania etanu przy stężeniach rzędu pojedynczych ppb w oddechu wystarczające jest obniżenie ciśnienia badanej próbki do 0,1 atm. Prowadzi to do

separacji widm (widocznej na rys. 39), a linia absorpcji C_2H_6 o długości fali 3336,8035 nm jest znacznie mniej zakłócona.



Rysunek 38: Widmo etanu i interferentów w oddechu – 1 atm.



Rysunek 39: Widmo etanu i interferentów w oddechu – 0,1 atm.

2.4.3. Modulacja długości fali i wybór harmonicznej

W przypadku stosowania spektroskopii modulacji długości fali (opisanej w rozdziale 1.5.1) ważnym zagadnieniem jest wybór odpowiedniej harmonicznej sygnału, na której następuje pomiar. Zwykle jest to pierwsza (kiedy modulacja odbywa się po zboczu linii absorpcyjnej) lub druga (kiedy przechodzi przez maksimum linii). W przypadku wykorzystania laserów półprzewodnikowych (należy do nich również używany w eksperymencie ICL) konieczne jest uwzględnienie faktu, że wraz ze zmianą prądu zasilania następuje nie tylko zmiana długości fali, ale także i mocy emitowanego promieniowania. W związku z tym, szeroko stosowanym rozwiązaniem jest detekcja sygnału na drugiej harmonicznej. Pozwala to odciąć wpływ niepożądanej modulacji mocy na pomiar. Jest to jednak możliwe tylko wtedy, gdy charakterystyka prądowo-mocowa lasera jest liniowa. Niestety, badania laserów ICL firmy Nanoplus przeprowadzone dla obu urządzeń (do detekcji odpowiednio formaldehydu i etanu) wykazały ich dużą nieliniowość, co dla urządzenia etanowego pokazano na rys. 40.

Modulację prądu lasera w czasie można opisać jako:

$$I(t) = I_0 + \Delta I \cos \omega t \quad (2.4.3.1)$$

gdzie $\omega = 2\pi f$ – to częstość kołowa modulacji, I_0 oznacza składową stałą prądu, a ΔI amplitudę modulacji. Amplituda modulacji prądu jest niewielka w porównaniu z zakresem strojenia lasera. Wynikająca z niej zmiana długości fali może być więc przedstawiona jako:

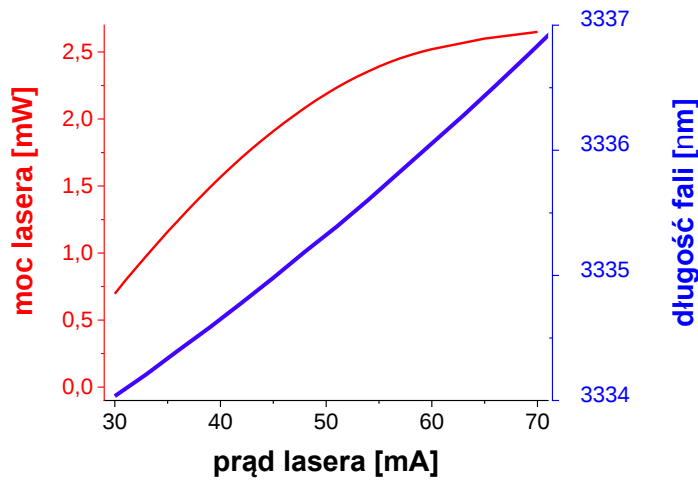
$$\lambda(t) \approx \lambda_0 + \left. \frac{d\lambda}{dI} \right|_{I_0} \Delta I \cos \omega t \quad (2.4.3.2)$$

gdzie $\lambda_0 = \lambda(I_0)$ jest długością fali, wokół której zachodzi modulacja. Wartość $\left. \frac{d\lambda}{dI} \right|_{I_0}$ wynika wprost z zależności długości fali od prądu (rys. 40).

W rozważaniach należy również uwzględnić wpływ modulacji prądu na moc lasera (czerwona krzywa na rys. 40). Charakterystyka ta może być bardzo dobrze (wsp. korelacji $> 0,9999$) przybliżona wielomianem drugiego stopnia. Oznacza to, że w przypadku harmonicznego modulacji prądu w funkcji czasu z częstością ω moc emitowanego światła można przedstawić wzorem:

$$P(t) \approx P_0 + \Delta_P \cos \omega t + \Delta_{2P} \cos^2 \omega t$$

gdzie P_0 oznacza składową stałą, a amplitudy pierwszej $\left(\Delta_P = \Delta I \frac{dP}{dI} \Big|_{I_0}\right)$ i drugiej harmonicznego $\left(\Delta_{2P} = \frac{1}{2} \Delta P^2 \frac{d^2 P}{dI^2} \Big|_{I_0}\right)$ są proporcjonalne do odpowiednich pochodnych mocy lasera po amplitudzie prądu modulacji.



Rysunek 40: Charakterystyki prąd – moc i prąd – długość fali lasera do detekcji etanu w temperaturze 20°C.

Moc wiązki światła po przejściu przez z absorbujący gaz wynosi:

$$P_T(t) = P(t) \exp[-\gamma(t)]$$

gdzie $\gamma = \alpha L$ – oznacza grubość optyczną gazu. Przy założeniu, że $\gamma(t) \ll 1$ (co jest spełnione w przypadku pomiarów biomarkerów znajdujących się w oddechu w śladowych ilościach), można zastosować przybliżenie:

$$P_T(t) \approx P(t)[1 - \gamma(t)] \quad (2.4.3.3)$$

Dla niewielkiego zakresu modulacji długości fali grubość optyczną można przybliżyć wzorem:

$$\gamma(t) \approx \gamma_0 + \gamma_1 \cos \omega t + \gamma_2 \cos^2 \omega t \quad (2.4.3.4)$$

Połączenie powyższych formuł daje:

$$P_T(t) = (P_0 + \Delta_P \cos \omega t + \Delta_{2P} \cos^2 \omega t)(1 - \gamma_0 - \gamma_1 \cos \omega t - \gamma_2 \cos^2 \omega t) \quad (2.4.3.5)$$

Przyjmując, że sygnał elektryczny z fotodetektora jest liniowo zależny od mocy światła padającego na detektor ($s = \chi P_T$, ze współczynnikiem proporcjonalności χ) oraz przekształcając odpowiednio równanie 2.4.3.5, można wyrazić go wzorem:

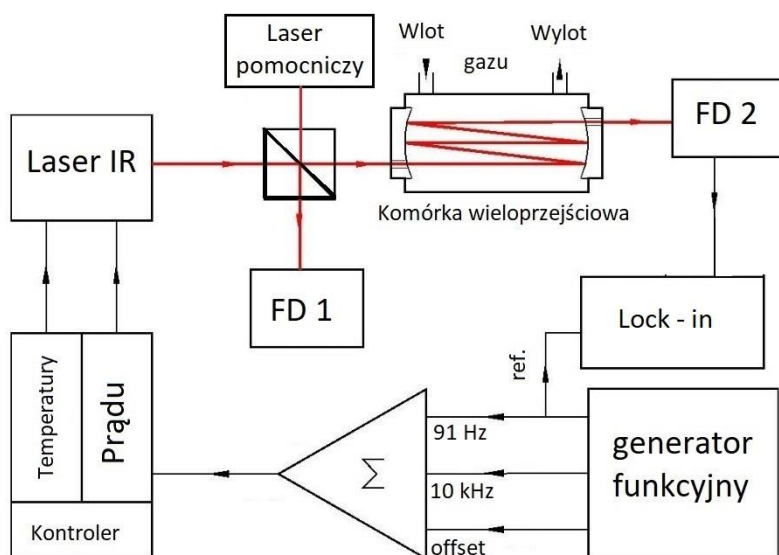
$$\begin{aligned}
 s(t) = \chi P_T(t) = \chi & \left(P_0 - P_0 \gamma_0 + \frac{\Delta_{2P} - P_0 \gamma_2 - \gamma_1 \Delta_P - \gamma_0 \Delta_{2P}}{2} - \frac{3}{8} \gamma_2 \Delta_{2P} \right) + \\
 & + \chi \left(\Delta_P - P_0 \gamma_1 - \gamma_0 \Delta_P - \frac{3 \gamma_2 \Delta_P + 3 \gamma_1 \Delta_{2P}}{4} \right) \cos \omega t + \\
 & + \frac{\chi}{2} (\Delta_{2P} - P_0 \gamma_2 - \gamma_1 \Delta_P - \gamma_0 \Delta_{2P} - \gamma_2 \Delta_{2P}) \cos 2\omega t + \\
 & - \chi (\gamma_2 \Delta_P + \gamma_1 \Delta_{2P}) \cos 3\omega t + \\
 & - \frac{\chi}{8} \gamma_2 \Delta_{2P} \cos 4\omega t
 \end{aligned}$$

gdzie – ze względu na przejrzystość – wyrażenia odpowiadające kolejnym harmonicznym przedstawiono w kolejnych wierszach.

W typowym przypadku, gdy długość fali i moc lasera zależą liniowo od prądu lasera ($\Delta_{2P} = 0$, $\alpha_2 = 0$), amplituda drugiej harmonicznej sygnału zostaje zredukowana do postaci: $\chi \gamma_1 \Delta_P / 2$, tj. jest proporcjonalna do stężenia absorbera i wyższe harmoniczne nie pojawiają się w sygnale. W przypadku nieliniowej zależności tych wielkości od prądu (jak na rys. 40) zawartość składowej stałej sygnału oraz amplitudy pierwszej, drugiej i trzeciej harmonicznej są kombinacjami kilku parametrów. W związku z tym amplituda drugiej harmonicznej zależy nie tylko od stężenia absorbera, ale również od czynnika Δ_{2P} , który nie jest związany z gęstością absorbera (jest to parametr lasera). Dodatkowo, w takim przypadku zależność sygnału o częstotliwości 2ω od koncentracji badanego gazu nie jest liniowa. Natomiast amplituda czwartej harmonicznej sygnału jest proporcjonalna jedynie do drugiej pochodnej funkcji kształtu linii (α_2), czyli proporcjonalna do stężenia badanego absorbera. W związku z tym w eksperymencie detekcję etanu przeprowadzono wykorzystując czwartą harmoniczną sygnału.

2.4.4. Układ pomiarowy

Schemat doświadczenia z etanem uległ pewnym istotnym zmianom w porównaniu do eksperymentu z detekcją formaldehydu (opisanego w rozdziale 2.3.4). Stało się tak przede wszystkim z uwagi na kształt widma tego związku (pojedyncza linia absorpcyjna) oraz ze względu na fakt, że C_2H_6 nie osiada na ściankach aparatury. Układ pomiarowy przedstawiony jest na rys. 41.



Rysunek 41: Schemat układu pomiarowego do detekcji etanu.

Podobnie jak w przypadku detekcji formaldehydu, po przejściu przez płytkę światłodziącą i komórkę wieloprześciową główna wiązka laserowa trafiała do fotodetektora FD2. Przy pomiarze etanu sygnał z fotodetektora rejestrowany był jednak przy użyciu woltomierza homodynowego [183]. Przyrząd ten (Stanford, SR830) umożliwia detekcję na 10 harmonicznych sygnału modulacji, co jest przydatne w przypadku stosowania techniki WMS (rozdz. 1.5.1). Zgodnie z analizą z rozdziału 2.4.3, w eksperymencie wykorzystywana była czwarta harmoniczna.

Długość fali lasera była modulowana za pomocą sygnału sterującego kontrolerem prądu zasilającego. Sygnał ten powstawał wskutek zsumowania trzech przebiegów (dwóch zmiennych i jednego stałego) we wzmacniaczu sumującym. Wykorzystano wzmacniacz operacyjny pracujący w konfiguracji sumatora nieodwracającego fazę. Posiada on cztery wejścia, z których każde charakteryzuje się innym tłumieniem. Wynoszą one odpowiednio 0dB, -20dB, -40dB i -60dB. Sygnał wyjściowy był ważoną sumą poszczególnych wejść. Zastosowano rezystory o precyzji 0,1%. Metalowa obudowa urządzenia była ekranowana. Sumator pozwalał na połączenie kilku kanałów generatora (z różnym wzmocnieniem) w jedno wyjście. Ponadto, z uwagi na tłumienie sygnału (w zależności od używanego kanału), zwiększał dostępną dynamikę oraz zmniejszał względny błąd używanego generatora. Działo się tak, ponieważ sygnały wymagane do pożądanej modulacji lasera (w szczególności redukcji zakłóceń optycznych opisaną w innej części pracy) charakteryzują się amplitudą rzędu kilkudziesięciu miliwoltów, podczas gdy amplituda pracy generatora jest rzędu woltów.

Na wejścia sumatora podano sygnały z generatora funkcyjnego. Kanał o częstotliwości 91 Hz służył modulacji prądu (a przez to również i długości fali) lasera umożliwiając zastosowanie spektroskopii modulacji długości fali (WMS). Ta częstotliwość została wybrana, gdyż odpowiada ona środkowi pasma przenoszenia używanego fotodetektora (0,1 Hz – 10kHz). Poza tym nie pokrywa się z częstotliwością sieci energetycznej (50 Hz) ani jej harmonicznymi. Amplituda modulacji jest dostosowana do

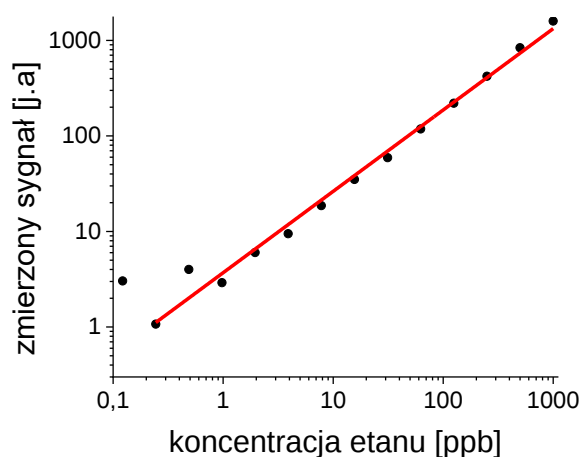
szerokości badanej linii absorpcyjnej, a więc jest dobierana dla konkretnego gazu i ciśnienia badanej próbki z uwzględnieniem wpływu interferentów.

Drugi kanał generatora służył do redukcji zakłóceń optycznych. Szczegóły tej metody opisane są w rozdziale 2.1.3. Wybrano częstotliwość 10 kHz ponieważ jest to najwyższa dostępna dla używanego fotodetektora. Ponadto, jest ona ponad dwa rzędy wielkości większa od częstotliwości używanej do modulacji długości fali lasera (i nie jest jej wielokrotnością).

Składowa stała służyła do schodkowego przestrajania długości fali. Miało to istotne znaczenie w eksperymencie opisanym w rozdziale 2.4.6, w którym laser do detekcji etanu wykorzystano do wykrywania kilku różnych gazów.

2.4.5. Wyniki pomiarów

W celu przetestowania zarówno detekcyjności, jak i liniowości czujnika etanu do przygotowywania próbek zastosowano podobną metodę jak w przypadku formaldehydu - stopniowe rozcieńczanie wzorcowej mieszaniny odniesienia (1 ± 0.05 ppm C_2H_6 w azocie). Procedurę tę i użytą aparaturę opisano w rozdziale 2.3.5. W kolejnych krokach uzyskiwano mieszaninę o stężeniu etanu dwukrotnie mniejszym w stosunku do stanu poprzedniego, za każdym razem dokonując rejestracji koncentracji za pomocą systemu laserowego. Działania te powtarzano aż do osiągnięcia granicy czułości układu. Zebrane w ten sposób dane przedstawiono na rys. 42. W przeciwieństwie do formaldehydu, etan nie osadza się na ściankach aparatury pomiarowej, dlatego możliwe były kolejne podziały jego stężenia o czynnik 2.



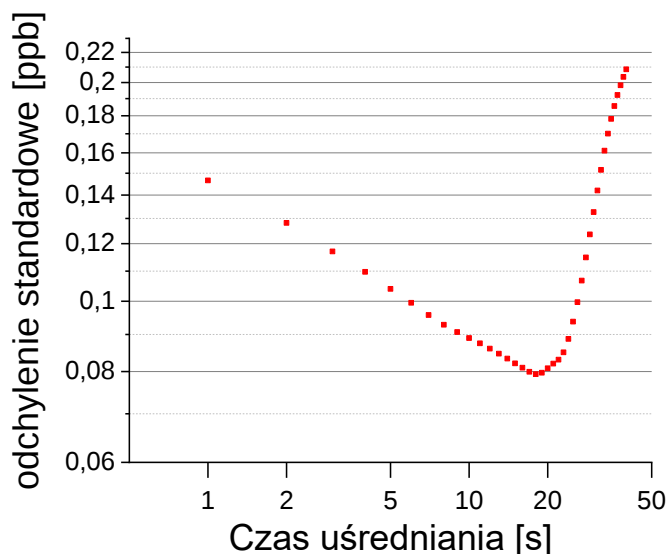
Rysunek 42: Wyniki pomiar koncentracji etanu.

Niepewność określenia koncentracji etanu po kolejnych k krokach rozcieńczania może być opisana wzorem:

$$\frac{\Delta N_k}{N_k} = \sqrt{\left(\frac{\Delta N_r}{N_r}\right)^2 + (k+1) \left(\frac{\Delta p}{p}\right)^2} \quad (2.4.5.1)$$

gdzie $\frac{\Delta N_r}{N_r} = 5\%$ oznacza niepewność koncentracji mieszaniny wzorcowej, a $\frac{\Delta p}{p} = 1\%$ niepewność pomiaru ciśnienia. Niepewność $\frac{\Delta N_k}{N_k}$ zmienia się z 5% do ok. 6.2% po dwunastu krokach rozcieńczania.

Czujnik pracował liniowo od stężenia 1 ppm do 1 ppb (przy ciśnieniu 0,1 atm). Oznacza to graniczną koncentrację cząsteczek etanu ok. $2.7 \cdot 10^9 \text{ cm}^{-3}$.

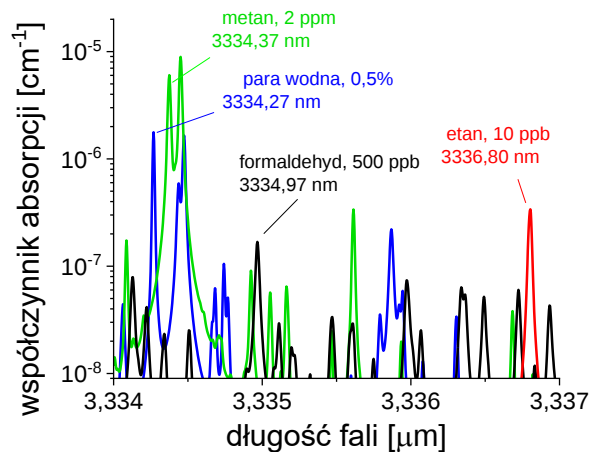


Rysunek 43: Wykres odchylenia Allana dla pomiaru stężenia etanu.

Wykonano również wykres odchylenia Allana. Jest to szeroko używana metoda, mająca na celu określenie precyzji pomiaru [184]. W uproszczeniu, polega ona na wyznaczeniu odchylenia standardowego dla różnych czasów uśredniania sygnału. Prowadzi to do znalezienia optymalnego czasu uśredniania, jak również pozwala na zmierzenie największej możliwej do uzyskania precyzji pomiaru. W ten sposób określono, że optymalny czas całkowania przy pomiarze etanu wynosi 20 s i uzyskuje się w tym wypadku odchylenie standardowe około 80 ppt (rys. 43). Eksperymentalnie osiągnięty próg detekcji 1 ppb jest wystarczający do badania powietrza wydychanego z płuc człowieka, gdyż chorobowy poziom etanu wynosi około 3,5 ppb [185], a krótki czas uśredniania pozwala na prowadzenie badań w czasie rzeczywistym.

2.4.6. Detekcja kilku gazów przy pomocy jednego lasera

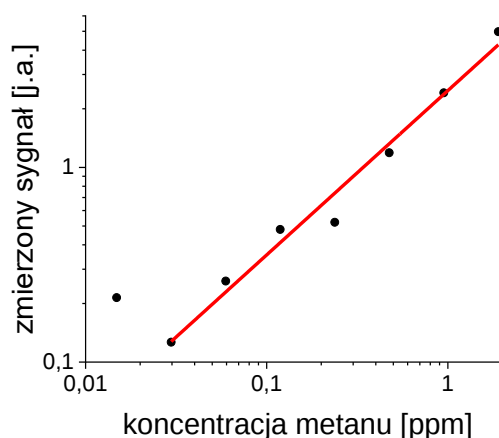
Ze względu na możliwość przestrajania lasera używanego do detekcji etanu w zakresie 3334 – 3337 nm (rys. 40), można pokusić się o próbę pomiaru więcej niż jednej substancji. Gazy takie jak para wodna, metan, a także formaldehyd stanowią interferenty przy wyznaczaniu stężenia etanu w oddechu, ale z drugiej strony ich linie absorpcyjne położone są na tyle blisko siebie, że odpowiednio zmieniając długość fali lasera istnieje możliwość pomiaru ich koncentracji. Jednocześnie ich widma są one dostatecznie rozdzielone pod ciśnieniem 0,1 atm (woda – 3334,27 nm, metan – 3334,37 nm, formaldehyd – 3334,97 nm, etan – 3336,80) i nie zakłócają się nawzajem (rys. 44).



Rysunek 44: Widma gazów możliwych do wykrycia za pomocą lasera do detekcji etanu.

Wykrywanie kilku różnych gazów w oddechu może nieść dodatkową informację diagnostyczną bez zwiększania nakładów sprzętowych. Ponadto nie jest konieczne pobranie dodatkowej próbki wydychanego powietrza. Pasmo 3,334 – 3,337 μm zostało wybrane przede wszystkim pod kątem silnej absorpcji etanu, stąd przekroje czynne dla innych gazów są względnie niewielkie. W związku z tym ich progowe mieralne koncentracje będą odpowiednio wyższe, jednak nadal mogą być interesujące. Warto zaznaczyć, że przy odpowiednim doborze temperatury diody laserowej zakres przestrajania jego długości fali wskutek zmiany prądu zasilania obejmuje linie absorpcyjne wszystkich czterech gazów (metan, etan, para wodna, formaldehyd). Do dostrajania lasera do tych linii wystarczy wykorzystać składową stałą (*offset*) generatora funkcyjnego już używanego w układzie.

Sprawdzenie detekcyjności układu dla gazów wymienionych powyżej związków w zakresie 3,334 - 3,337 μm przeprowadzono przy ciśnieniu wynoszącym 0,1 atm. Procedura rozrzedzania próbki za pomocą czystego azotu była analogiczna jak opisana w rozdz. 2.3.5. Wyniki pomiarów zaprezentowane są na rys. 45-47.

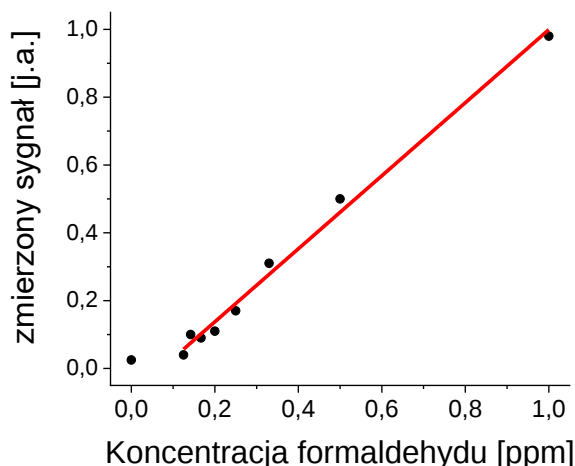


Rysunek 45: Zależność sygnału sensora od koncentracji metanu.

Stosunkowo wysoki współczynnik absorpcji metanu pozwala na skuteczne wykrywanie tego związku. Zidentyfikowano go jako biomarker fermentacji w okrężnicy i problemów jelitowych [¹⁸⁶], a poziom chorobowy określono na 10 ppm. Ze względu na fakt,

że wzorcowa mieszanina nie była dostępna w laboratorium, jako przybliżone stężenie odniesienia przyjęto średnią koncentrację CH_4 w otaczającym powietrzu – 1,9 ppm⁶. Detektor pracował liniowo (rys. 45) do poziomu rozcieńczenia 1/64. Oznacza to, że użyteczny próg detekcji metanu w naszym systemie wynosił około 30 ppb.

Optyczne wykrywanie metanu było dotychczas prezentowane w różnych zakresach bliskiej i średniej podczerwieni przy użyciu spektrofotometrii jednoprzęściowej, WMS i metod fotoakustycznych [¹⁸⁷, ¹⁸⁸], a także z wykorzystaniem światłowodu [¹⁸⁹]. Osiągnięto porównywalne granice wykrywalności.



Rysunek 46: Pomiar koncentracji formaldehydu.

Opisywany tu sensor został także sprawdzony jako detektor formaldehydu. Zastosowania detekcji tego gazu zostały opisane w rozdziale 2.3.1 Wyniki pomiarów przedstawiono na rys. 46. Czujnik pracował liniowo do wartości progowej 0,1 ppm. Wspomniana linia absorpcji ma przekrój czynny ok. 50 razy mniejszy niż linia, na której przeprowadzano pomiary opisane w rozdziale 2.3.8, gdzie osiągnięto granice detekcji rzędu pojedynczych ppb. Mimo to detekcja na tej linii jest czulsza niż za pomocą prostych czujników elektronicznych (o małej selektywności, ze względu na inne węglowodory) i pozwala na wykrycie niebezpiecznych koncentracji tego gazu w atmosferze.

Przy testowaniu opisywanego czujnika etanu jako sensora pary wodnej jako próbek używano powietrza z laboratorium. Posługując się higrometrem można zmierzyć jego względną wilgotność (RH), czyli stosunek aktualnego stężenia cząstek H_2O ($N_{\text{H}_2\text{O}}$) do stężenia cząstek w parze nasyconej (N_s) w danej temperaturze (T_p). Z kolei znajomość temperatury pozwala wyznaczyć ciśnienie pary nasyconej H_2O za pomocą wzoru Magnusa-Tetensa [¹⁹⁰]:

$$p_s(T_p) = 6.11 \cdot 10^{\frac{7,5T_p}{273,3+T_p}} \quad [\text{hPa}] \quad 2.4.6.1$$

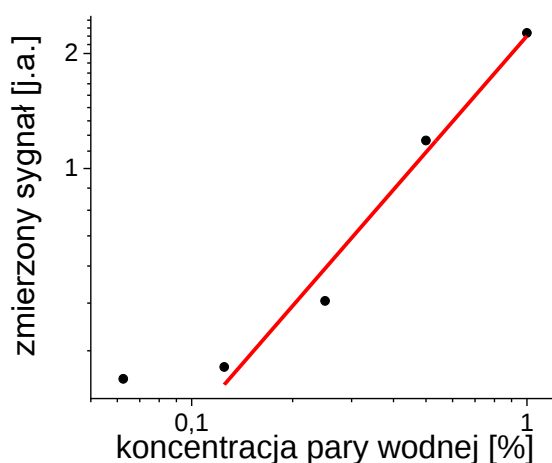
⁶ Średnia koncentracja metanu mierzona przez Instytut Geofizyki PAN przy użyciu detektora HORIBA APHA370

a w dalszej kolejności odpowiadającą mu koncentrację cząstek wody

$$N_{H_2O} = RH \cdot N_S = RH \frac{p_S}{k_B T_p} \quad 2.4.6.2$$

gdzie k_B oznacza stałą Boltzmanna.

Podczas eksperymentu w laboratorium zarejestrowano temperaturę 23°C i wilgotność względną $RH = 35\%$. Odpowiadało to stężeniu $N_{H_2O} = 2,4 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$. Detekcję przeprowadzono na linii 3334,27 nm. Czujnik pracował liniowo do poziomu rozcieńczenia H_2O około 1/10, co odpowiada $2,9 \cdot 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ cząsteczek w warunkach normalnych (0,1 % – rys. 47).



Rysunek 47: Pomiar koncentracji pary wodnej.

Eksperymenty z metanem, formaldehydem i parą wodną wykazały, że gazy te mogą być skutecznie wykrywane bez dodatkowych nakładów pracy i kosztów za pomocą urządzenia pierwotnie przeznaczonego do detekcji etanu.

Podsumowanie

Rezultaty opisanych eksperymentów jednoznacznie wskazują, że spektroskopia laserowa (z wykorzystaniem technik zwiększających jej czułość) daje możliwość selektywnego wykrywania biomarkerów w oddechu w czasie rzeczywistym. Osiągnięto czułość detekcji rzędu 6,6 ppb dla formaldehydu oraz 1 ppb dla etanu.

W trakcie przeprowadzonych prac wykonana została szczegółowa analiza widm wydychanych gazów w podczerwieni, w wyniku której znalezione zostały najlepsze linie absorpcyjne pod kątem czułości i selektywności pomiaru.

Opracowanie zostało oprogramowanie służące do symulacji i optymalizacji komórek wieloprzejściowych. Za jego pomocą zaprojektowano konstrukcje służące do wykrywania biomarkerów.

Natrafiając na problem zakłóceń optycznych dokonano analizy ich powstawania. Opracowano i przetestowano metodę ich tłumienia poprzez dodatkową modulację długości fali lasera z amplitudą dopasowaną do widmowej separacji prążków interferencyjnych tworzących te zakłócenia i uśrednianie sygnału.

Zaprezentowano skuteczną metodę pomiaru śladowych ilości formaldehydu w próbkach mimo, że gaz ten ma tendencję do osadzania się na ściankach urządzenia pomiarowego. Ten sposób może być wykorzystany przy detekcji innych gazów o podobnych właściwościach, jak np. amoniak.

Przedstawiona została technika pomiaru z modulacją długości fali mająca zastosowanie w przypadku użycia laserów wykazujących silną nieliniowość. Pokazano również, jak mierzyć kilka gazów za pomocą jednego układu.

Skonstruowane zostały przenośne, w pełni funkcjonalne prototypy urządzeń służących do klinicznej detekcji biomarkerów w oddechu. Zawierają one autorskie komórki wieloprzejściowe, jak również układ pneumatyczny służący do automatyzacji ich pracy. Ponadto konstrukcje elektroniczne służące do kontroli prądu i temperatury (a w konsekwencji długości fali) lasera zostały opracowane w całości przez autora pracy.

Wyniki badań związanych z niniejszą rozprawą były na bieżąco publikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Powstały następujące artykuły, których w większości jestem pierwszym autorem:

1. Winkowski, Mateusz, and Tadeusz Stacewicz. "Optical detection of formaldehyde in air in the 3.6 μm range." *Biomedical Optics Express* 11.12 (2020): 7019-7031.
2. Winkowski, M., and T. Stacewicz. "Optical interference suppression using wavelength modulation." *Optics Communications* 480 (2021): 126464.
3. Brzozowski, A. Belina, M. Winkowski, and T. Stacewicz. "Software for design and analysis of multi-pass absorption cells." *Ukrainian Journal of Physical Optics* 22.1 (2021): 1-11.
4. Winkowski, Mateusz, et al. "Optoelectronic detection of disease biomarkers in air exhaled from human lungs." *Acta Physica Polonica A* 139.3 (2021): 231-235.
5. Winkowski, Mateusz, and Tadeusz Stacewicz. "Detection of ethane, methane, formaldehyde and water vapor in the 3.33 μm range." *metrology and measurement systems* (2022): 271-282.

Pomysły i rozwiązania opracowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano w innych układach detekcyjnych i działaniach doświadczalnych, w których autor niniejszej dysertacji brał udział. Doprowadziły one do powstania następujących artykułów naukowych:

1. Winkowski, Mateusz, and Tadeusz Stacewicz. "Low noise, open-source QEPAS system with instrumentation amplifier." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 1838.
2. Stacewicz, Tadeusz, Mateusz Winkowski, and Natalia Kuk. "Reduction of optical noise in near-infrared range laser hygrometry." *Metrology and Measurement Systems* (2023): 169-181.
3. Sławek, N., Kumala, W., Winkowski, M., & Stacewicz, T. *Real-Time System for Monitoring the Water Vapour Concentration and Temperature of Air Exhaled from Human Lungs* - przyjęta do druku w *Sensing and Bio-Sensing Research*.

Rezultaty niniejszej pracy doktorskiej były również prezentowane na konferencjach naukowych:

- M. Winkowski, T. Stacewicz, J. Wojtas, M. Gałązka, Z. Bielecki, S. Chojnowski, *Optical detection of cancer biomarkers in human breath*, 6th International Conference on Photonics, Optics and laser Technology, PHOTOPTICS 2018, Funchal, Madeira – Portugal, 25 – 27 January 2018.
- T. Stacewicz, Z. Bielecki J. Wojtas, P. Magryta, M. Winkowski, *Laser spectroscopy for trace matter detection in air*, Optics and Laser Technology PHOTOPTICS 2018, Funchal, Madeira – Portugal, 25 – 27 January 2018.
- Belina Brzozowski, M. Winkowski, T. Stacewicz, *Analiza systemu do laserowej spektroskopii wieloprzeźściowej: modelowanie, optymalizacja i eksperyment*, XII Sympozjum Techniki Laserowej, Jastarnia, 25 – 27. 09. 2018.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Precyzyjny wzmacniacz napięciowy do zastosowań w laserowej spektroskopii fotoakustycznej QEPAS*, XII Sympozjum Techniki Laserowej, Jastarnia, 25 – 27. 09. 2018.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, Z. Bielecki, J. Wojtas, *Optoelectronic detection of disease biomarkers in air exhaled from human lungs*, Nadzwyczajny Zjazd Fizyków Polskich, Warszawa, 16 – 18.10.2020.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Łmumienie szumów optycznych w komórkach wieloprzeźściowych za pomocą modulacji długości fali*, I Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, 30 czerwca – 1 lipca 2020 r.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Sensing of ethane and formaldehyde in air using mid-infrared laser radiation*, The Optical Society of America, Optical Sensors and Sensing Congress, 19 – 23 July 2021.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Wykrywanie śladowych ilości etanu oraz formaldehydu w powietrzu za pomocą spektroskopii laserowej w podczerwieni*, Druga Wirtualna Konferencja Naukowa Kampusu Ochota, 10.09.2021.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Laser detection of formaldehyde and ethane in human breath as potential disease biomarkers*, OPTO2022, 18 – 21 July 2022.
- N. Sławek, W. Kumala, T. Stacewicz, M. Winkowski, *Laser detection of water vapor in air exhaled from human lungs*, OPTO2022, Warszawa, 18 – 21 July 2022.

- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Laserowa detekcja formaldehydu i etanu – potencjalnych biomarkerów chorób układu oddechowego* – XIII Sympozjum Techniki Laserowej, Karpacz, 19 – 23 września 2022.
- N. Sławek, W. Kumala, M. Winkowski T. Stacewicz, *Laserowy układ do badania koncentracji cząsteczek wody w oddechu ludzkim*, XIII Sympozjum Techniki Laserowej, Karpacz, 19 – 23 września 2022.
- M. Winkowski, T. Stacewicz, *Laser detection of formaldehyde and ethane in human breath as potential disease biomarkers*, Frontiers in Optics, Rochester, USA, 16 – 21 October 2022.

Dodatek: Prototypy sensorów formaldehydu i etanu do celów medycznych

Doświadczenia zdobyte podczas prac nad układami doświadczalnymi, a także wyniki badań i testów (opisane w części 2 rozprawy) zostały wykorzystane przy budowie prototypów przenośnych sensorów formaldehydu i etanu do zastosowań medycznych. Pozwalają one na przeprowadzenie testów klinicznych poprzez bezpośredni pomiar tych biomarkerów w powietrzu wydychanym z płuc przez pacjentów. Automatyzacja procesu pomiarowego i odpowiednie oprogramowanie sensora umożliwia obsługę przez personel medyczny. Dwa takie urządzenia (rys. 48-49) zostały skonstruowane w ramach współpracy ze firmą typu start-up Wahaf Pharma. Trafiły one do szpitala Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego WUM w Warszawie.



Rysunek 48: Układ przeznaczony do badań klinicznych – obudowa zamknięta. Na pierwszym planie widoczne przyłącze do podłączenia węża, którym pobierana jest próbka powietrza od badanej osoby.



Rysunek 49: Układ przeznaczony do badań klinicznych – obudowa otwarta. Na pierwszym planie widoczna komórka wieloprzejściowa.

3.1. Układ pomiarowy

Konstruując urządzenia do badań klinicznych wykorzystano schematy opisane w rozdziale 3 niniejszej pracy. Dokonane zostały jednak istotne zmiany, mające na celu zapewnienie mobilności, zwiększenie czułości detekcji biomarkerów oraz automatyzację obsługi.

Czułość detekcji biomarkerów udało się zwiększyć budując nową komórkę wieloprześciową o dłuższej drodze optycznej wynoszącej ok. 40 metrów. Użyto w niej dwucalowych zwierciadeł z otworem bocznym (Thorlabs, CM508-200EH4-M02). Jej konstrukcja umożliwia wytwarzanie wewnątrz próżni o resztkowym ciśnieniu gazów 10^{-4} atm.

W celu zapewnienia mobilności urządzenia poczyniono szereg modyfikacji. Układy elektroniczne takie jak m.in. zautomatyzowany kontroler układu próżniowego, kontroler prądu lasera, kontroler temperatury lasera, sumator i układ stabilizacji napięcia zostały wykonane na samodzielnie zaprojektowanych płytkach PCB, co pozwoliło na oszczędność znacznej ilości miejsca w stosunku do kontrolerów laboratoryjnych. Ponadto, urządzenia takie jak oscyloskop i lock-in zostały zastąpione ich miniaturowymi odpowiednikami (odpowiednio Tie-Pie HS6 i Anfatec USBLockIn250). Nie zawierają one wyświetlacza ani przełączników, a są obsługiwane za pomocą komputera PC poprzez złącza USB. Do wytwarzania próżni użyto miniaturowej bezsmarowej pompy spiralnej (Scroll Labs SVF-E1M-50PC) o niewielkim rozmiarze i wadze.

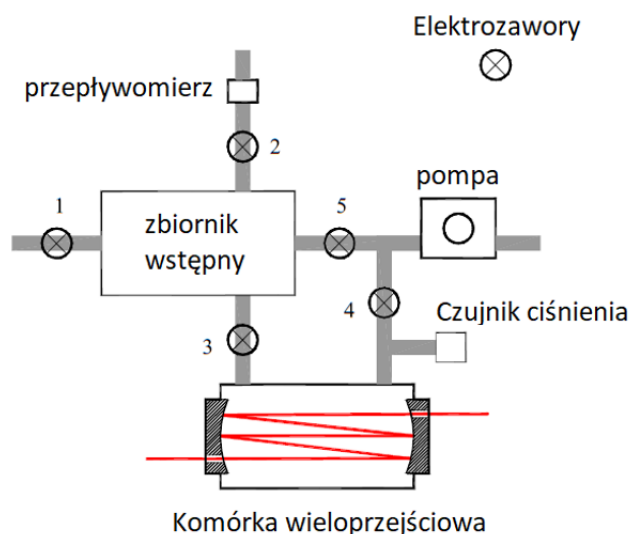
W konstrukcji urządzenia służącego do badań klinicznych konieczna była automatyzacja procesu pobierania i badania próbek wydychanego powietrza. Gwarantowała ona powtarzalność pomiarów oraz ich uproszczenie, umożliwiające samodzielną obsługę przez personel medyczny. Do sterowania układu użyto komputera PC. Konstrukcja układów elektronicznych – kontrolerów układu próżniowego, prądu lasera i temperatury lasera pozwalały na dwustronną komunikację z jednostką centralną. Umożliwiało to nadzór oraz łatwą zmianę parametrów ich pracy. Także pozostałe urządzenia, jak oscyloskop, lock-in oraz generator funkcyjny były sterowane przez komputer. Personel medyczny miał do dyspozycji program z przejrzystym, graficznym interfejsem pozwalającym na prowadzenie badań oraz zapisanie ich wyników wraz z danymi pacjenta.

3.2. Układ próżniowy

Jakkolwiek zasadnicza metoda wykrywania gazów pozostała niezmieniona, konieczna była gruntowna przebudowa części próżniowej opisanej w rozdziale 2.3.5 w celu dostosowania jej do pobierania próbek od pacjentów.

Zadaniem tego układu było zautomatyzowane oczyszczenie urządzenia przed wykonaniem badania, pobranie próbki od pacjenta, dostarczenie jej do komory wieloprześciowej pod odpowiednim ciśnieniem, a na koniec oczyszczenie układu po wykonaniu badania. Jego schemat przedstawiono na rys. 50. Składał się on ze zbiornika wstępnego, przepływomierza (Omron D6F-20A6), miniaturowej bezolejowej pompy

próżniowej oraz miernika ciśnienia (MKS Baratron 722B). Były one połączone ze sobą za pomocą zaworów sterowanych elektrycznie i łączyły się z komórką wieloprześciową. Całość była obsługiwana przez mikrokontroler.



Rysunek 50: Schemat uproszczony układu próżniowego w systemie do badań klinicznych.

3.3. Procedura badawcza

Działanie układu jest następujące: przed przystąpieniem do badania pacjenta – w celu oczyszczenia urządzenia – uruchamiana jest pompa oraz otwierane są zawory 3, 4 i 5. Po osiągnięciu próżni o ciśnieniu resztkowym < 0.002 atm pompa pracuje jeszcze przez minutę. W dalszej kolejności, przed poborem próbki oddechu od pacjenta zawory 3, 4 i 5 są zamykane, a 1 i 2 otwierane, dzięki czemu zbiornik wstępny ulega zapowietrzeniu.

Podczas badania pacjent wdmuchuje powietrze do zbiornika wstępnego przez zawór 1. Ciśnienie w zbiorniku jest wtedy równe atmosferycznemu. Stanowi to zabezpieczenie przed działaniem próżni na badaną osobę. Zbiornik ma objętość około 0.7 l. Nadmiar wydychanego powietrza uchodzi przez zawór 2 i przepływomierz określający zarówno aktualny przepływ powietrza, jak i jego całkowitą objętość. Obie te wielkości zależą od objętości płuc i ogólnej kondycji badanego - dla zdrowej osoby zwykle jest to kilka litrów. Po zakończeniu pobierania próbki (wykryciu przez przepływomierz ustania przepływu gazu lub przepływu w odwrotnym kierunku) zawory 1 i 2 są natychmiast zamykane.

Po pomyślnym pobraniu próbki następuje otwarcie zaworu 3, przez który komórka wieloprześciowa jest napełniana ze zbiornika wstępnego do ciśnienia nieznacznie przekraczającego ciśnienie pomiarowe. Dopasowanie tego ciśnienia do wartości docelowej następuje w wyniku pracy pompy próżniowej. W tym celu zawór 3 jest zamykany, a uruchamiana jest pompa i następuje otwarcie zaworu 4. Ciśnienie w komórce jest na bieżąco monitorowane za pomocą baratronu. W chwili osiągnięcia odpowiedniej wartości zawór 4

jest zamykany, a pompa wyłączana, po czym następuje pomiar koncentracji biomarkera za pomocą układu optycznego.

Ostatnim etapem jest czyszczenie układu po badaniu. Jest ono analogiczne do kroku pierwszego: uruchamiana jest pompa próżniowa, a zawory 3, 4 i 5 są otwierane. W przypadku pomiaru powietrza wydychanego przez kolejnego pacjenta bezpośrednio po poprzedniej osobie, opisana procedura czyszczenia stanowi jednocześnie pierwszy krok następnego badania.

Bibliografia

-
- ¹ Zhang, Lizhu, et al. "Applications of absorption spectroscopy using quantum cascade lasers." *Applied spectroscopy* 68.10 (2014): 1095-1107.
 - ² Zahniser, Mark S., et al. "Infrared QC laser applications to field measurements of atmospheric trace gas sources and sinks in environmental research: enhanced capabilities using continuous wave QCLs." *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices VI*. Vol. 7222. SPIE, 2009.
 - ³ Wang, Chuji, and Peeyush Sahay. "Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits." *Sensors* 9.10 (2009): 8230-8262.
 - ⁴ Miller, J. Houston, et al. "Detection of formaldehyde using off-axis integrated cavity output spectroscopy with an interband cascade laser." *Applied Physics B* 85 (2006): 391-396.
 - ⁵ Henderson, Ben, et al. "Laser spectroscopy for breath analysis: towards clinical implementation." *Applied Physics B* 124 (2018): 1-21.
 - ⁶ Buszewski, Bogusław, et al. "Detection of volatile organic compounds as biomarkers in breath analysis by different analytical techniques." *Bioanalysis* 5.18 (2013): 2287-2306.
 - ⁷ Rudnicka, Joanna, et al. "Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography–mass spectrometry versus trained dogs." *Sensors and Actuators B: Chemical* 202 (2014): 615-621.
 - ⁸ Wojtas, J., et al. "Ultrasensitive laser spectroscopy for breath analysis." *Opto-electronics review* 20 (2012): 26-39.
 - ⁹ Ulanowska, Agnieszka, et al. "Hyphenated and unconventional methods for searching volatile cancer biomarkers." *Ecol. Chem. Eng* 17.1 (2010): 9-23.
 - ¹⁰ Ashutosh, Kumar. "Nitric oxide and asthma: a review." *Current opinion in pulmonary medicine* 6.1 (2000): 21-25.
 - ¹¹ Paredi, P., et al. "Changes in exhaled carbon monoxide and nitric oxide levels following allergen challenge in patients with asthma." *European Respiratory Journal* 13.1 (1999): 48-52.
 - ¹² Paredi, Paolo, Sergei A. Kharitonov, and Peter J. Barnes. "Elevation of exhaled ethane concentration in asthma." *American journal of respiratory and critical care medicine* 162.4 (2000): 1450-1454.
 - ¹³ Fuchs, Patricia, et al. "Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer." *International Journal of Cancer* 126.11 (2010): 2663-2670.
 - ¹⁴ Španěl, Patrik, et al. "Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry." *Rapid communications in mass spectrometry* 13.14 (1999): 1354-1359.
 - ¹⁵ Saasa, Valentine, et al. "Sensing technologies for detection of acetone in human breath for diabetes diagnosis and monitoring." *Diagnostics* 8.1 (2018): 12.
 - ¹⁶ Kearney, David J., Todd Hubbard, and David Putnam. "Breath ammonia measurement in *Helicobacter pylori* infection." *Digestive diseases and sciences* 47.11 (2002): 2523-2530.
 - ¹⁷ Sehnert, Shelley S., et al. "Breath biomarkers for detection of human liver diseases: preliminary study." *Biomarkers* 7.2 (2002): 174-187.
 - ¹⁸ Enderby, Beth, et al. "Hydrogen cyanide as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the breath of children with cystic fibrosis." *Pediatric pulmonology* 44.2 (2009): 142-147.
 - ¹⁹ Ebeler, Susan E., Andrew J. Clifford, and Takayuki Shibamoto. "Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 702.1-2 (1997): 211-215.
 - ²⁰ Chen, Xing, et al. "A study of the volatile organic compounds exhaled by lung cancer cells in vitro for breath diagnosis." *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* 110.4 (2007): 835-844.

-
- ²¹ Pillatsch, Lex, Fredrik Östlund, and Johann Michler. "FIBSIMS: A review of secondary ion mass spectrometry for analytical dual beam focussed ion beam instruments." *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* 65.1 (2019): 1-19.
- ²² Biasioli, Franco, et al. "PTR-MS monitoring of VOCs and BVOCs in food science and technology." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30.7 (2011): 968-977.
- ²³ Smith, David, and Patrik Španěl. "Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) for on-line trace gas analysis." *Mass spectrometry reviews* 24.5 (2005): 661-700.
- ²⁴ Pustelny, Tadeusz. *Physical and technical aspects of optoelectronic sensors*. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, 2005.
- ²⁵ Janata, Jiri, and Mira Josowicz. "Conducting polymers in electronic chemical sensors." *Nature materials* 2.1 (2003): 19-24.
- ²⁶ Bratkowski, A., et al. "Novel gas sensor based on porous silicon measured by photovoltage, photoluminescence, and admittance spectroscopy." *Opto-electronics review* 13.1 (2005): 35-38.
- ²⁷ Aroutiounian, V. M. "Exhaled Breath Semiconductor Sensors for Diagnostics of Respiratory Diseases." *Armenian Journal of Physics* 15.1 (2022).
- ²⁸ Aroutiounian, V. M. "Acetone Sensor Made of Tin Dioxide." *Journal of Contemporary Physics (Armenian Academy of Sciences)* 55.3 (2020): 213-224.
- ²⁹ Kharitonov, Sergei A., and Peter J. Barnes. "Exhaled markers of pulmonary disease." *American journal of respiratory and critical care medicine* 163.7 (2001): 1693-1722.
- ³⁰ Staerz, Anna, Udo Weimar, and Nicolae Barsan. "Understanding the potential of WO₃ based sensors for breath analysis." *Sensors* 16.11 (2016): 1815.
- ³¹ Willis, Carolyn M., et al. "Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs." *Cancer Biomarkers* 8.3 (2011): 145-153.
- ³² Jurgen R. Meyer-Arendt, *Wstęp do optyki*, PWN, Warszawa 1977.
- ³³ Demtröder, W., *Laser spectroscopy*, Springer 1973.
- ³⁴ Taslakov, M., et al. "Open-path ozone detection by quantum-cascade laser." *Applied Physics B* 82.3 (2006): 501-506.
- ³⁵ Ott, Henry W. *Metody redukcji zakłóceń i szumów w układach elektronicznych*. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1979.
- ³⁶ Scofield, John H. "Frequency-domain description of a lock-in amplifier." *American journal of physics* 62.2 (1994): 129-133.
- ³⁷ Pfund, August H. "An infrared spectrometer of large aperture." *JOSA* 14.4 (1927): 337-338.
- ³⁸ White, John U. "Long optical paths of large aperture." *JOSA* 32.5 (1942): 285-288.
- ³⁹ Herriott, Donald R., and Harry J. Schulte. "Folded optical delay lines." *Applied Optics* 4.8 (1965): 883-889.
- ⁴⁰ Krzempek, Karol, et al. "CW DFB RT diode laser-based sensor for trace-gas detection of ethane using a novel compact multipass gas absorption cell." *Applied Physics B* 112.4 (2013): 461-465.
- ⁴¹ Graf, Manuel, Lukas Emmenegger, and Béla Tuzson. "Compact, circular, and optically stable multipass cell for mobile laser absorption spectroscopy." *Optics letters* 43.11 (2018): 2434-2437.
- ⁴² McManus, J. Barry, Paul L. Kebabian, and M. S. Zahniser. "Astigmatic mirror multipass absorption cells for long-path-length spectroscopy." *Applied Optics* 34.18 (1995): 3336-3348.
- ⁴³ Hudzikowski, Arkadiusz, et al. "Compact, spherical mirror-based dense astigmatic-like pattern multipass cell design aided by a genetic algorithm." *Optics Express* 29.16 (2021): 26127-26136.
- ⁴⁴ https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=12671 [dostęp: 23.06.2023]
- ⁴⁵ O'Keefe, Anthony, and David AG Deacon. "Cavity ring-down optical spectrometer for absorption measurements using pulsed laser sources." *Review of scientific instruments* 59.12 (1988): 2544-2551.
- ⁴⁶ Berden, Giel, and Richard Engeln, *Cavity ring-down spectroscopy: techniques and applications*. John Wiley & Sons, 2009.

-
- ⁴⁷ Bitter, M., et al. "A broadband cavity ringdown spectrometer for in-situ measurements of atmospheric trace gases." *Atmospheric Chemistry and Physics* 5.9 (2005): 2547-2560.
- ⁴⁸ Romanini, Daniele, et al. "CW cavity ring down spectroscopy." *Chemical Physics Letters* 264.3-4 (1997): 316-322.
- ⁴⁹ Hahn, Jae Won, et al. "Cavity ringdown spectroscopy with a continuous-wave laser: calculation of coupling efficiency and a new spectrometer design." *Applied optics* 38.9 (1999): 1859-1866.
- ⁵⁰ Herbelin, J. M., et al. "Sensitive measurement of photon lifetime and true reflectances in an optical cavity by a phase-shift method." *Applied Optics* 19.1 (1980): 144-147.
- ⁵¹ Cygan, Agata, et al. "High-accuracy and wide dynamic range frequency-based dispersion spectroscopy in an optical cavity." *Optics Express* 27.15 (2019): 21810-21821.
- ⁵² Bielska, Katarzyna, et al. "Frequency-based dispersion Lamb-dip spectroscopy in a high finesse optical cavity." *Optics Express* 29.24 (2021): 39449-39460.
- ⁵³ Bielska, Katarzyna, et al. "Subpromille Measurements and Calculations of CO (3–0) Overtone Line Intensities." *Physical Review Letters* 129.4 (2022): 043002.
- ⁵⁴ Li, Jingsong, Weidong Chen, and Benli Yu. "Recent progress on infrared photoacoustic spectroscopy techniques." *Applied Spectroscopy Reviews* 46.6 (2011): 440-471.
- ⁵⁵ Gong, Zhenfeng, et al. "Ppb-level detection of methane based on an optimized T-type photoacoustic cell and a NIR diode laser." *Photoacoustics* 21 (2021): 100216.
- ⁵⁶ Huang, Qi, et al. "Modeling of a cylindrical resonant photoacoustic cell for high sensitive gas detection." *Microwave and Optical Technology Letters* 63.10 (2021): 2528-2534.
- ⁵⁷ Zhang, Chu, Qiaoyun Wang, and Xiangyu Yin. "Photoacoustic spectroscopy for detection of trace C₂H₂ using ellipsoidal photoacoustic cell." *Optics Communications* 487 (2021): 126764.
- ⁵⁸ Li, Zhengang, et al. "Highly Sensitive Sphere-Tube Coupled Photoacoustic Cell Suitable for Detection of a Variety of Trace Gases: NO₂ as an Example." *Sensors* 22.1 (2021): 281.
- ⁵⁹ Kosterev, Anatoliy A., et al. "Applications of quartz tuning forks in spectroscopic gas sensing." *review of scientific instruments* 76.4 (2005): 043105.
- ⁶⁰ Kosterev, A. A., et al. "QEPAS detector for rapid spectral measurements." *Applied Physics B* 100 (2010): 173-180.
- ⁶¹ Friedt, J-M., and E. Carry. "Introduction to the quartz tuning fork." *American Journal of Physics* 75.5 (2007): 415-422.
- ⁶² Dong, Lei, et al. "QEPAS spectrophones: design, optimization, and performance." *Applied Physics B* 100 (2010): 627-635.
- ⁶³ Dong, Lei, et al. "Ppb-level detection of nitric oxide using an external cavity quantum cascade laser based QEPAS sensor." *Optics Express* 19.24 (2011): 24037-24045.
- ⁶⁴ Lewicki, Rafał, et al. "Real time ammonia detection in exhaled human breath using a distributed feedback quantum cascade laser based sensor." *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices VIII*. Vol. 7945. SPIE, 2011.
- ⁶⁵ Dong, L., et al. "Ultra-sensitive carbon monoxide detection by using EC-QCL based quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy." *Applied Physics B* 107.2 (2012): 275-283.
- ⁶⁶ Lewicki, Rafał, et al. "QEPAS based detection of broadband absorbing molecules using a widely tunable, cw quantum cascade laser at 8.4 μ m." *Optics Express* 15.12 (2007): 7357-7366.
- ⁶⁷ Wojcik, Michael D., et al. "Gas-phase photoacoustic sensor at 8.41 μ m using quartz tuning forks and amplitude-modulated quantum cascade lasers." *Applied Physics B* 85 (2006): 307-313.
- ⁶⁸ Liu, Kun, et al. "Off-beam quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy." *Optics Letters* 34.10 (2009): 1594-1596.
- ⁶⁹ Ma, Yufei, et al. "Multi-quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy." *Applied Physics Letters* 107.2 (2015): 021106.

-
- ⁷⁰ Patimisco, P., Sampaolo, A., Dong, L., Giglio, M., Scamarcio, G., Tittel, F. K., & Spagnolo, V. "Analysis of the electro-elastic properties of custom quartz tuning forks for optoacoustic gas sensing." *Sensors and Actuators B: Chemical*, 227, 539-546, (2016).
- ⁷¹ Cui, Ruyue, et al. "Multiple-sound-source-excitation quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy based on a single-line spot pattern multi-pass cell." *Applied Physics Letters* 118.16 (2021): 161101.
- ⁷² Wojtas, Jacek, et al. "Mid-infrared trace gas sensor technology based on intracavity quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy." *Sensors* 17.3 (2017): 513.
- ⁷³ Schilt, Stéphane, Anatoliy A. Kosterev, and Frank K. Tittel. "Performance evaluation of a near infrared QEPAS based ethylene sensor." *Applied Physics B* 95 (2009): 813-824.
- ⁷⁴ Wu, Hongpeng, et al. "Beat frequency quartz-enhanced photoacoustic spectroscopy for fast and calibration-free continuous trace-gas monitoring." *Nature communications* 8.1 (2017): 15331.
- ⁷⁵ Jahjah, M., A. Vicet, and Y. Rouillard. "A QEPAS based methane sensor with a 2.35 μm antimonide laser." *Applied Physics B* 106 (2012): 483-489.
- ⁷⁶ Wojcik, Michael D., Mark C. Phillips, and Bret D. Cannon. "Gas phase photoacoustic spectroscopy in the long-wave IR using quartz tuning forks and amplitude modulated quantum cascade lasers." *Optical Methods in the Life Sciences*. Vol. 6386. SPIE, 2006.
- ⁷⁷ Winkowski, Mateusz, and Tadeusz Stacewicz. "Low noise, open-source QEPAS system with instrumentation amplifier." *Scientific Reports* 9.1 (2019): 1838.
- ⁷⁸ Nikodem, Michał, et al. "Hollow core fiber-assisted absorption spectroscopy of methane at 3.4 μm ." *Optics Express* 26.17 (2018): 21843-21848.
- ⁷⁹ Anderson, George P., and Chris Rowe Taitt. "Evanescent wave fiber optic biosensors." *Optical Biosensors*. Elsevier, (2008): 83-138.
- ⁸⁰ Nikodem, Michał, and Gerard Wysocki. "Chirped laser dispersion spectroscopy for remote open-path trace-gas sensing." *Sensors* 12.12 (2012): 16466-16481.
- ⁸¹ Krzempek, Karol, Grzegorz Dudzik, and Krzysztof Abramski. "Photothermal spectroscopy of CO₂ in an intracavity mode-locked fiber laser configuration." *Optics express* 26.22 (2018): 28861-28871.
- ⁸² Kowalczyk, P. *Fizyka cząsteczek*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- ⁸³ Whiting, Ellis E. "An empirical approximation to the Voigt profile." *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 8.6 (1968): 1379-1384.
- ⁸⁴ Kęcki, Z. *Podstawy Spektroskopii Molekularnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN, 1992.
- ⁸⁵ Rothman, Laurence S., et al. "The HITRAN2012 molecular spectroscopic database." *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 130 (2013): 4-50.
- ⁸⁶ Rothman, Laurence S. "History of the HITRAN Database." *Nature Reviews Physics* 3.5 (2021): 302-304.
- ⁸⁷ Kochanov, Roman V., et al. "HITRAN Application Programming Interface (HAPI): A comprehensive approach to working with spectroscopic data." *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 177 (2016): 15-30.
- ⁸⁸ Perrin, A., et al. "Absolute line intensities measurements and calculations for the 5.7 and 3.6 μm bands of formaldehyde." *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 110.9-10 (2009): 700-716.
- ⁸⁹ Perrin, A., A. Valentin, and L. Daumont. "New analysis of the 2v₄, v₄+v₆, 2v₆, v₃+v₄, v₃+v₆, v₁, v₅, v₂+v₄, 2v₃, v₂+v₆ and v₂+v₃ bands of formaldehyde H₂12C₁₆O: Line positions and intensities in the 3.5 μm spectral region." *Journal of Molecular Structure* 780 (2006): 28-44.
- ⁹⁰ Brown, Linda R., Robert H. Hunt, and Alan S. Pine. "Wavenumbers, line strengths, and assignments in the Doppler-limited spectrum of formaldehyde from 2700 to 3000 cm⁻¹." *Journal of Molecular Spectroscopy* 75.3 (1979): 406-428.
- ⁹¹ Villanueva, G. L., M. J. Mumma, and K. Magee-Sauer. "Ethane in planetary and cometary atmospheres: Transmittance and fluorescence models of the v₇ band at 3.3 μm ." *Journal of Geophysical Research: Planets* 116.E8 (2011).

-
- ⁹² Harrison, Jeremy J., Nicholas DC Allen, and Peter F. Bernath. "Infrared absorption cross sections for ethane (C₂H₆) in the 3 μ m region." *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 111.3 (2010): 357-363.
- ⁹³ Pine, A. S., and W. J. Lafferty. "Torsional splittings and assignments of the Doppler-limited spectrum of ethane in the CH stretching region." *JOURNAL OF RESEARCH of the National Bureau of Standards* 87.3 (1982): 237.
- ⁹⁴ Majsztrik, Paul W., et al. "Water sorption, desorption and transport in Nafion membranes." *Journal of Membrane Science* 301.1-2 (2007): 93-106.
- ⁹⁵ Wheeler, Martyn D., et al. "Cavity ring-down spectroscopy." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 94.3 (1998): 337-351.
- ⁹⁶ Brzozowski, A. Belina, M. Winkowski, and T. Stacewicz. "Software for design and analysis of multi-pass absorption cells." *Ukrainian Journal of Physical Optics* 22.1 (2021): 1-11.
- ⁹⁷ Opracowanie własne na podstawie <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Etalon-1.svg>, dostęp: 23.06.2023
- ⁹⁸ Silver, Joel A., and Alan C. Stanton. "Optical interference fringe reduction in laser absorption experiments." *Applied optics* 27.10 (1988): 1914-1916.
- ⁹⁹ McManus, J. Barry, and Paul L. Keabian. "Narrow optical interference fringes for certain setup conditions in multipass absorption cells of the Herriott type." *Applied optics* 29.7 (1990): 898-900.
- ¹⁰⁰ Mangold, Markus, Bela Tuzson, and Lukas Emmenegger. "Method for reducing interference fringes in laser spectroscopy measurements using an absorption mask in combination with multi-pass optical cells." U.S. Patent No. 9,638,624. 2 May 2017.
- ¹⁰¹ Tuzson, Béla, et al. "Compact multipass optical cell for laser spectroscopy." *Optics letters* 38.3 (2013): 257-259.
- ¹⁰² Silver, Joel A., and Alan C. Stanton. "Optical interference fringe reduction in laser absorption experiments." *Applied optics* 27.10 (1988): 1914-1916.
- ¹⁰³ Kronfeldt, H-D. "Piezo-enhanced multireflection cells applied for in-situ measurements of trace-gas concentrations." *Lens and Optical Systems Design*. Vol. 1780. SPIE, 1993.
- ¹⁰⁴ Fried, Alan, et al. "Reduction of interference fringes in small multipass absorption cells by pressure modulation." *Applied optics* 29.7 (1990): 900-902.
- ¹⁰⁵ Liger, V. V. "Optical fringes reduction in ultrasensitive diode laser absorption spectroscopy." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 55.10 (1999): 2021-2026.
- ¹⁰⁶ Webster, Christopher R. "Brewster-plate spoiler: a novel method for reducing the amplitude of interference fringes that limit tunable-laser absorption sensitivities." *JOSA B* 2.9 (1985): 1464-1470.
- ¹⁰⁷ Winkowski, Mateusz, and Tadeusz Stacewicz. "Optical detection of formaldehyde in air in the 3.6 μ m range." *Biomedical Optics Express* 11.12 (2020): 7019-7031.
- ¹⁰⁸ Lee, Lim, et al. "Reduction of fringe noise in a multi-pass absorption cell by using the wavelength modulation technique." *Journal of the Korean Physical Society* 57.2 (2010): 364-368.
- ¹⁰⁹ Hannemann, M., et al. "Influence of age and sex in exhaled breath samples investigated by means of infrared laser absorption spectroscopy." *Journal of breath research* 5.2 (2011): 027101.
- ¹¹⁰ Elia, Angela, et al. "Photoacoustic techniques for trace gas sensing based on semiconductor laser sources." *Sensors* 9.12 (2009): 9616-9628.
- ¹¹¹ Formaldehyde, W. H. O. "Concise international chemical assessment document 40." World Health Organization, Geneva, Switzerland (2002).
- ¹¹² Ritchie, Ingrid M., and Robert G. Lehnen. "Formaldehyde-related health complaints of residents living in mobile and conventional homes." *American journal of public health* 77.3 (1987): 323-328.
- ¹¹³ Malaka, Tan, and Arthur M. Kodama. "Respiratory health of plywood workers occupationally exposed to formaldehyde." *Archives of Environmental Health: An International Journal* 45.5 (1990): 288-294.
- ¹¹⁴ Salthammer, Tunga, Sibel Mentese, and Rainer Marutzky. "Formaldehyde in the indoor environment." *Chemical reviews* 110.4 (2010): 2536-2572.

-
- ¹¹⁵ Chung, Po-Ren, et al. "Formaldehyde gas sensors: a review." *Sensors* 13.4 (2013): 4468-4484.
- ¹¹⁶ Morgan, Kevin T. "A brief review of formaldehyde carcinogenesis in relation to rat nasal pathology and human health risk assessment." *Toxicologic pathology* 25.3 (1997): 291-305.
- ¹¹⁷ McLaughlin, Joseph K. "Formaldehyde and cancer: a critical review." *International archives of occupational and environmental health* 66 (1994): 295-301.
- ¹¹⁸ German, Jeffrey A., and Michael B. Harper. "Environmental control of allergic diseases." *American Family Physician* 66.3 (2002): 421.
- ¹¹⁹ Von Mutius, Erika. "Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma." *Journal of allergy and clinical immunology* 109.6 (2002): S525-S532.
- ¹²⁰ Kim, W. J., et al. "Effect of formaldehyde on the expression of adhesion molecules in nasal microvascular endothelial cells: the role of formaldehyde in the pathogenesis of sick building syndrome." *Clinical & Experimental Allergy* 32.2 (2002): 287-295.
- ¹²¹ Chen, Jinhai, et al. "Atmospheric formaldehyde monitoring in the Greater Houston area in 2002." *Applied Spectroscopy* 58.2 (2004): 243-247.
- ¹²² World Health Organization. *Air quality guidelines: global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide*. World Health Organization, 2006.
- ¹²³ Wert, B. P., et al. "Signatures of terminal alkene oxidation in airborne formaldehyde measurements during TexAQs 2000." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 108.D3 (2003).
- ¹²⁴ Wang, Chuji, and Peeyush Sahay. "Breath analysis using laser spectroscopic techniques: breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits." *Sensors* 9.10 (2009): 8230-8262.
- ¹²⁵ Wehinger, Andreas, et al. "Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas." *International Journal of Mass Spectrometry* 265.1 (2007): 49-59.
- ¹²⁶ Fernandes, Melanie Patsy, S. Venkatesh, and B. G. Sudarshan. "Early detection of lung cancer using nano-nose-a review." *The open biomedical engineering journal* 9 (2015): 228.
- ¹²⁷ Fuchs, Patricia, et al. "Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer." *International Journal of Cancer* 126.11 (2010): 2663-2670.
- ¹²⁸ Miller, J. Houston, et al. "Detection of formaldehyde using off-axis integrated cavity output spectroscopy with an interband cascade laser." *Applied Physics B* 85 (2006): 391-396.
- ¹²⁹ Hirschmann, C. B., et al. "Sub-ppb detection of formaldehyde with cantilever enhanced photoacoustic spectroscopy using quantum cascade laser source." *Applied Physics B* 111 (2013): 603-610.
- ¹³⁰ Ebeler, Susan E., Andrew J. Clifford, and Takayuki Shibamoto. "Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human." *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 702.1-2 (1997): 211-215.
- ¹³¹ Costa, Solange, et al. "Occupational exposure to formaldehyde and early biomarkers of cancer risk, immunotoxicity and susceptibility." *Environmental research* 179 (2019): 108740.
- ¹³² Wehinger, Andreas, et al. "Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas." *International Journal of Mass Spectrometry* 265.1 (2007): 49-59.
- ¹³³ Mann, B., and M. L. Grayeski. "New chemiluminescent derivatizing agent for the analysis of aldehydes and ketones by high-performance liquid chromatography with peroxyoxalate chemiluminescence." *Journal of Chromatography A* 386 (1987): 149-158.
- ¹³⁴ Levin, Jan Olof, et al. "Determination of sub-part-per-million levels of formaldehyde in air using active or passive sampling on 2, 4-dinitrophenylhydrazine-coated glass fiber filters and high-performance liquid chromatography." *Analytical Chemistry* 57.6 (1985): 1032-1035.
- ¹³⁵ Hopkins, J. R., et al. "A simplified apparatus for ambient formaldehyde detection via GC-pHID." *Atmospheric Environment* 37.18 (2003): 2557-2565.
- ¹³⁶ Dumas, T. "Determination of formaldehyde in air by gas chromatography." *Journal of Chromatography A* 247.2 (1982): 289-295.

-
- ¹³⁷ Lorrain, Jeffrey M., Christopher R. Fortune, and Barry Dellinger. "Sampling and ion chromatographic determination of formaldehyde and acetaldehyde." *Analytical Chemistry* 53.8 (1981): 1302-1305.
- ¹³⁸ prof. dr hab. Bogusław Buszewski, dr hab. Tomasz Ligor, Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu - informacja ustna
- ¹³⁹ Lee, Chia-Yen, et al. "A self-heating gas sensor with integrated NiO thin-film for formaldehyde detection." *Sensors and Actuators B: Chemical* 122.2 (2007): 503-510.
- ¹⁴⁰ Wang, Jing, et al. "Silicon-based micro-gas sensors for detecting formaldehyde." *Sensors and Actuators B: Chemical* 136.2 (2009): 399-404.
- ¹⁴¹ Wang, Jing, et al. "An enrichment method to detect low concentration formaldehyde." *Sensors and Actuators B: Chemical* 134.2 (2008): 1010-1015.
- ¹⁴² Hämmerle, Martin, et al. "Electrochemical enzyme sensor for formaldehyde operating in the gas phase." *Biosensors and Bioelectronics* 11.3 (1996): 239-246.
- ¹⁴³ Ma, Qiang, Honglei Cui, and Xingguang Su. "Highly sensitive gaseous formaldehyde sensor with CdTe quantum dots multilayer films." *Biosensors and Bioelectronics* 25.4 (2009): 839-844.
- ¹⁴⁴ Möhlmann, G. R. "Formaldehyde detection in air by laser-induced fluorescence." *Applied spectroscopy* 39.1 (1985): 98-101.
- ¹⁴⁵ Cazorla, M., et al. "A new airborne laser-induced fluorescence instrument for in situ detection of formaldehyde throughout the troposphere and lower stratosphere." *Atmospheric Measurement Techniques* 8.2 (2015): 541-552.
- ¹⁴⁶ Hottle, John R., et al. "A laser induced fluorescence-based instrument for in-situ measurements of atmospheric formaldehyde." *Environmental science & technology* 43.3 (2009): 790-795.
- ¹⁴⁷ Hirschmann, C. B., et al. "Sub-ppb detection of formaldehyde with cantilever enhanced photoacoustic spectroscopy using quantum cascade laser source." *Applied Physics B* 111 (2013): 603-610.
- ¹⁴⁸ Maisons, G., et al. "Optical-feedback cavity-enhanced absorption spectroscopy with a quantum cascade laser." *Optics letters* 35.21 (2010): 3607-3609.
- ¹⁴⁹ Ren, Wei, Longqiang Luo, and Frank K. Tittel. "Sensitive detection of formaldehyde using an interband cascade laser near 3.6 μm ." *Sensors and Actuators B: Chemical* 221 (2015): 1062-1068.
- ¹⁵⁰ Lundqvist, Stefan, et al. "Sensing of formaldehyde using a distributed feedback interband cascade laser emitting around 3493 nm." *Applied optics* 51.25 (2012): 6009-6013.
- ¹⁵¹ Mine, Y., et al. "Detection of formaldehyde using mid infrared difference-frequency generation." *Applied Physics-Section B-Lasers and Optics* 65.6 (1997): 771-774.
- ¹⁵² Friedfeld, Stephen, et al. "Field intercomparison of a novel optical sensor for formaldehyde quantification." *Geophysical Research Letters* 27.14 (2000): 2093-2096.
- ¹⁵³ Lancaster, David G., et al. "Difference-frequency-based tunable absorption spectrometer for detection of atmospheric formaldehyde." *Applied Optics* 39.24 (2000): 4436-4443.
- ¹⁵⁴ Rehle, D., et al. "Ambient formaldehyde detection with a laser spectrometer based on difference-frequency generation in PPLN." *Applied Physics B* 72 (2001): 947-952.
- ¹⁵⁵ Fried, Alan, et al. "Tunable diode laser measurements of formaldehyde during the TOPSE 2000 study: Distributions, trends, and model comparisons." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 108.D4 (2003).
- ¹⁵⁶ Wert, B. P., et al. "Signatures of terminal alkene oxidation in airborne formaldehyde measurements during TexAQs 2000." *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 108.D3 (2003).
- ¹⁵⁷ Miller, J. Houston, et al. "Detection of formaldehyde using off-axis integrated cavity output spectroscopy with an interband cascade laser." *Applied Physics B* 85 (2006): 391-396.
- ¹⁵⁸ Braswell, James R., David R. Spiner, and Robert K. Hoffman. "Adsorption of formaldehyde by various surfaces during gaseous decontamination." *Applied Microbiology* 20.5 (1970): 765-769.
- ¹⁵⁹ Arend, Michael, Bernhard Westermann, and Nikolaus Risch. "Modern variants of the Mannich reaction." *Angewandte Chemie International Edition* 37.8 (1998): 1044-1070.

-
- ¹⁶⁰ McCurdy, Matthew R., et al. "Recent advances of laser-spectroscopy-based techniques for applications in breath analysis." *Journal of breath research* 1.1 (2007): 014001.
- ¹⁶¹ Refat, Mamdouh, et al. "Utility of breath ethane as a noninvasive biomarker of vitamin E status in children." *Pediatric research* 30.5 (1991): 396-403.
- ¹⁶² Svedahl, Sindre Rabben, et al. "Inflammatory markers in blood and exhaled air after short-term exposure to cooking fumes." *Annals of occupational hygiene* 57.2 (2013): 230-239.
- ¹⁶³ McCurdy, Matthew R., et al. "Recent advances of laser-spectroscopy-based techniques for applications in breath analysis." *Journal of breath research* 1.1 (2007): 014001.
- ¹⁶⁴ Cope, K. A., et al. "Abnormal exhaled ethane concentrations in scleroderma." *Biomarkers* 11.1 (2006): 70-84.
- ¹⁶⁵ Barker, Michael, et al. "Volatile organic compounds in the exhaled breath of young patients with cystic fibrosis." *European Respiratory Journal* 27.5 (2006): 929-936.
- ¹⁶⁶ Paredi, Paolo, et al. "Exhaled ethane is elevated in cystic fibrosis and correlates with carbon monoxide levels and airway obstruction." *American journal of respiratory and critical care medicine* 161.4 (2000): 1247-1251.
- ¹⁶⁷ Kanoh, Soichiro, Hideo Kobayashi, and Kazuo Motoyoshi. "Exhaled ethane: an in vivo biomarker of lipid peroxidation in interstitial lung diseases." *Chest* 128.4 (2005): 2387-2392.
- ¹⁶⁸ Riely, Caroline A., Gerald Cohen, and Morris Lieberman. "Ethane evolution: a new index of lipid peroxidation." *Science* 183.4121 (1974): 208-210.
- ¹⁶⁹ Lawrence, Glen D., and Gerald Cohen. "Ethane exhalation as an index of in vivo lipid peroxidation: concentrating ethane from a breath collection chamber." *Analytical Biochemistry* 122.2 (1982): 283-290.
- ¹⁷⁰ Puri, Basant K., Brian M. Ross, and Ian H. Treasaden. "Increased levels of ethane, a non-invasive, quantitative, direct marker of n-3 lipid peroxidation, in the breath of patients with schizophrenia." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32.3 (2008): 858-862.
- ¹⁷¹ Ross, Brian M., Ross Maxwell, and Iain Glen. "Increased breath ethane levels in medicated patients with schizophrenia and bipolar disorder are unrelated to erythrocyte omega-3 fatty acid abundance." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 35.2 (2011): 446-453.
- ¹⁷² Ross, Brian M., Sandeep Shah, and Malcolm Peet. "Increased breath ethane and pentane concentrations in currently unmedicated patients with schizophrenia." *Open Journal of Psychiatry* 1.01 (2011).
- ¹⁷³ Paredi, Paolo, Sergei A. Kharitonov, and Peter J. Barnes. "Elevation of exhaled ethane concentration in asthma." *American journal of respiratory and critical care medicine* 162.4 (2000): 1450-1454.
- ¹⁷⁴ Skeldon, K. D., et al. "Application of laser spectroscopy for measurement of exhaled ethane in patients with lung cancer." *Respiratory medicine* 100.2 (2006): 300-306.
- ¹⁷⁵ Stevenson, K. S., et al. "Breath ethane peaks during a single haemodialysis session and is associated with time on dialysis." *Journal of Breath Research* 2.2 (2008): 026004.
- ¹⁷⁶ Patterson, Claire S., et al. "Dynamic study of oxidative stress in renal dialysis patients based on breath ethane measured by optical spectroscopy." *Journal of Breath Research* 1.2 (2007): 026005.
- ¹⁷⁷ Pico, Yolanda, Ahmed H. Alfarhan, and Damia Barcelo. "How recent innovations in gas chromatography-mass spectrometry have improved pesticide residue determination: An alternative technique to be in your radar." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 122 (2020): 115720.
- ¹⁷⁸ Patterson, Claire S., et al. "Portable optical spectroscopy for accurate analysis of ethane in exhaled breath." *Measurement Science and Technology* 18.5 (2007): 1459.
- ¹⁷⁹ Patterson, Claire S., et al. "Dynamic study of oxidative stress in renal dialysis patients based on breath ethane measured by optical spectroscopy." *Journal of Breath Research* 1.2 (2007): 026005.
- ¹⁸⁰ Halmer, D., et al. "Online monitoring of ethane traces in exhaled breath with a difference frequency generation spectrometer." *Applied Physics B* 85 (2006): 437-443.
- ¹⁸¹ Dahnke, H., et al. "Real-time monitoring of ethane in human breath using mid-infrared cavity leak-out spectroscopy." *Applied Physics B* 72 (2001): 971-975.
- ¹⁸² von Basum, Golo, et al. "Online recording of ethane traces in human breath via infrared laser spectroscopy." *Journal of Applied Physiology* 95.6 (2003): 2583-2590.

-
- ¹⁸³ Scofield, John H. "Frequency-domain description of a lock-in amplifier." *American journal of physics* 62.2 (1994): 129-133.
- ¹⁸⁴ Cutler, Leonard S., and Campbell L. Searle. "Some aspects of the theory and measurement of frequency fluctuations in frequency standards." *Proceedings of the IEEE* 54.2 (1966): 136-154.
- ¹⁸⁵ Stacewicz, T., et al. "Detection of disease markers in human breath with laser absorption spectroscopy." *Opto-Electronics Review* 24.2 (2016): 82-94.
- ¹⁸⁶ Le Marchand, Loic, et al. "Use of breath hydrogen and methane as markers of colonic fermentation in epidemiologic studies: circadian patterns of excretion." *Environmental Health Perspectives* 98 (1992): 199-202.
- ¹⁸⁷ Scotoni, M., et al. "Simultaneous detection of ammonia, methane and ethylene at 1.63 μm with diode laser photoacoustic spectroscopy." *Applied Physics B* 82 (2006): 495-500.
- ¹⁸⁸ Moskalenko, Konstantin L., Alexander I. Nadezhdinskii, and Inna A. Adamovskaya. "Human breath trace gas content study by tunable diode laser spectroscopy technique." *Infrared physics & technology* 37.1 (1996): 181-192.
- ¹⁸⁹ Jaworski, Piotr, et al. "Antiresonant hollow-core fiber-based dual gas sensor for detection of methane and carbon dioxide in the near-and mid-infrared regions." *Sensors* 20.14 (2020): 3813.
- ¹⁹⁰ Alduchov, Oleg A., and Robert E. Eskridge. "Improved Magnus form approximation of saturation vapor pressure." *Journal of Applied Meteorology and Climatology* 35.4 (1996): 601-609.