

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Сушков Николай Иванович

**Сочетание лазерно-искровой эмиссионной спектрометрии
и спектроскопии комбинационного рассеяния света
для установления взаимосвязей
элементного и молекулярного состава зоопланктона**

Специальность 1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Лабутин Тимур Александрович

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Особенности лазерно-индуцированной плазмы в качестве источника излучения для спектрального анализа	12
1.1.1. Лазерная абляция и образование плазмы	12
1.1.2. Свойства и параметры лазерно-индуцированной плазмы	15
1.1.3. Формирование лазерно-индуцированной плазмы и аналитического сигнала. Оборудование	18
1.1.4. Диагностика плазмы	20
1.1.5. Особенности прямого анализа биологических материалов методом ЛИЭС	25
1.2. Применение лазерно-искровой эмиссионной спектрометрии в элементном анализе	32
1.2.1. Общие замечания	32
1.2.2. Картирование эмиссионных сигналов	36
1.2.3. Лазерно-искровая эмиссионная спектроскопия без образцов сравнения	38
1.3. Принципы спектроскопии комбинационного рассеяния света (СКР)	45
1.4. Сочетание ЛИЭС и СКР	48
1.5. Хемометрические методы исследования экспериментальных данных	55
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	63
2.1. Анализируемые образцы	63
2.1.1. Общая характеристика морского зоопланктона	63
2.1.2. Описание анализируемых образцов	64
2.2. Лабораторная установка для лазерно-искровой эмиссионной спектрометрии	67
2.3. Спектрометр Applied Spectra	68
2.4. КР-микроскоп Thermo Scientific DXR	68
2.5. Предварительная обработка спектров	69
2.5.1. Программа для исключения выбросов	69
2.5.2. Программа для корректировки фона в спектрах КР	69
2.5.3. Программа для моделирования молекулярных эмиссионных спектров	70
2.5.4. Обработка изображений детектора	72
2.6. Методики расчёта температуры и электронной плотности плазмы	73

2.7. Оптимизация условий эксперимента для количественного анализа методом ЛИЭС	76
2.8. Выбор аналитических линий с использованием моделирования спектров плазмы.	77
2.9. Определение состава методом ЛИЭС без образцов сравнения	80
2.10. Предварительная обработка спектральных данных.	81
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	84
3.1. Элементный анализ биологических материалов методом ЛИЭС.....	84
3.1.1. Обсуждение эволюции плазмы различных биологических материалов	84
3.1.2. Рассмотрение данных с разбиением плазмы на зоны по высоте.	87
3.1.3. Сравнение различных способов определения элементного состава биоматериалов методом ЛИЭС с использованием множителя правильности.	89
3.1.4. Влияние различных источников погрешностей на воспроизводимость ЛИЭС БОС.	98
3.2. Исследование взаимосвязей элементного и молекулярного состава зоопланктона методами ЛИЭС и СКР.	101
3.2.1. Интерпретация спектров ЛИП и КР.	101
3.2.2. Анализ структуры данных ЛИЭС и СКР методом главных компонент и НМР.	103
3.2.1. Совместный анализ данных ЛИЭС и СКР.	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
БЛАГОДАРНОСТИ.....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЯ	140

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АНК — анализ независимых компонент.

АЭС–ИСП — атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой.

БОС — без образцов сравнения.

ГСО — государственные стандартные образцы.

ИК — инфракрасный.

КМОП — комплементарная структура металл–оксид–полупроводник.

КР — комбинационное рассеяние.

ЛИП — лазерно-индуцированная плазма.

ЛИЭС — лазерно-искровая эмиссионная спектроскопия.

ЛТР — локальное термодинамическое равновесие.

МГК — метод главных компонент.

МП — множитель правильности.

МС–ИСП — масс-спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой.

НМР — неотрицательное матричное разложение.

ОСКО — относительное стандартное квадратическое отклонение.

ОТП — обратное тормозное поглощение.

ПЗС — прибор с зарядовой связью.

РФС — рентгенофлуоресцентная спектроскопия.

СКО — стандартное квадратическое отклонение.

СКР — спектроскопия комбинационного рассеяния.

СО — стандартные образцы.

УФ — ультрафиолетовый.

ComDim — анализ общих компонент и удельных весов.

ВВЕДЕНИЕ

Биогеохимические исследования морей и океанов требуют получения самой разнообразной информации, в том числе о химическом (в том числе элементном) составе биоты с разрешением во времени и пространстве. Для этих исследований имеют большое значение скорость анализа и возможность его выполнения в реальном времени, т.е. непосредственно на борту научно-исследовательского судна или подводного аппарата. Если такая возможность имеется, то становится возможным и быстрое принятие решений по ходу экспедиции (уточнение курса, дополнительный отбор проб и пр.), что существенно повышает эффективность работы [1]. Однако применение ряда высокоточных методов элементного анализа затрудняется сложной процедурой подготовки проб к анализам — озоления образцов с “выжиганием” органической компоненты и последующим химическим разложением минерального остатка [2].

Для работы на борту судна желательны экспрессные прямые методы, не требующие вскрытия пробы и удобные в условиях экспедиции. Среди методов элементного анализа таковыми являются рентгенофлуоресцентная спектроскопия (**РФС**) и лазерно-искровая эмиссионная спектрометрия (**ЛИЭС**). В соответствии с физическими принципами, лежащими в основе этих методов, РФС предпочтительно использовать при определении относительно тяжёлых элементов в объектах минеральной природы, тогда как ЛИЭС имеет преимущество при определении лёгких элементов, таких как водород, литий, бериллий, бор, в разнообразных матрицах, в том числе в биологических тканях. Важное достоинство ЛИЭС — возможность локального анализа с получением профиля концентрации по глубине объекта, а также бесконтактного анализа, что позволяет проводить измерения дистанционно, в т.ч. под водой на больших глубинах или в космосе. Многие годы ЛИЭС используется для изучения объектов с органическими матрицами (картирование распределения элементов в биологических тканях, анализ бактерий, растений, пищевых продуктов, объектов культурного наследия, медицинская диагностика) [3].

Комплексное изучение химического состава можно осуществить путём совмещения ЛИЭС с другими прямыми методами анализа, дающими информацию о молекулярном составе образца. Практически идентичное устройство приборов делает перспективным сочетание ЛИЭС со спектроскопией комбинационного рассеяния света (**СКР**). Этот метод широко применяется для идентификации химических соединений и для анализа упорядоченности структур в геологии, биохимии, химической промышленности, анализе пищевых и фармацевтических продуктов. В СКР можно наблюдать сигналы

оксоанионов неметаллов, к которым ЛИЭС малочувствительна. Как и в ЛИЭС, в СКР возможен неразрушающий локальный и дистанционный анализ.

Для наиболее полного извлечения информации из комбинированных данных двух методов целесообразно использовать математические алгоритмы обработки многомерных данных (от метода главных компонент до более сложных методов разложения матриц и разрешения кривых). По их результатам можно судить о том, как изменение элементного состава находит своё отражение в особенностях молекулярного состава, а также выделять группы образцов, сходные по какому-либо скрытому признаку [4].

Одна из актуальных научных задач, которая может решаться с применением сочетания ЛИЭС и СКР, связана с анализом зоопланктона. Относительно недавно было обнаружено, что некоторые виды морских ракообразных способны к аномальному накоплению ряда химических элементов в своих тканях [5]. Причины и механизмы этого явления пока не выяснены. По-видимому, для их установления целесообразно комплексное изучение химического состава тканей, а также поиск корреляций между особенностями элементного и молекулярного состава.

Целью настоящей работы была оценка возможностей сочетания лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния света и математических методов обработки многомерных данных, имея в виду использование этого сочетания для оценки элементного и молекулярного состава морского зоопланктона и выявления связей между этими составами.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи:**

1) Изучение эволюции температуры и электронной плотности лазерной плазмы, образующейся при испарении зоопланктона, для выбора временных параметров регистрации эмиссионных линий для аналитических измерений.

2) Расчёт состава по данным ЛИЭС с использованием образцов сравнения и без них. Сравнение результатов определения состава методом ЛИЭС без образцов сравнения (ЛИЭС БОС), ЛИЭС с градуировочной зависимостью и данных независимого анализа.

3) Оценка применимости ЛИЭС БОС для исследования зоопланктона.

4) Анализ структуры данных ЛИЭС и спектроскопии комбинационного рассеяния света с использованием метода главных компонент и неотрицательного матричного разложения для выявления характеристичных сигналов.

5) Оценка эффективности сочетания ЛИЭС, СКР и математических методов обработки многомерных данных на примере кластеризации образцов и выявления корреляций между элементным и молекулярным составом образцов зоопланктона.

Объектами исследования являлись образцы морского зоопланктона Северного Ледовитого океана и Чёрного моря, а также стандартные образцы химического состава животных и растительных тканей.

Предметом исследования были способы определения элементного и молекулярного состава зоопланктона (и взаимосвязей этих составов) с использованием ЛИЭС, СКР света и методов хеометрики.

Методология и методы исследования. Сочетание лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света. Обработка полученных спектров с помощью математических методов анализа многомерных данных.

Научная новизна:

1) Предложена интегральная метрика для оценки погрешности анализа — множитель правильности. Она показывает степень отклонения измеренных значений от эталонных; при этом 10 % результатов с наибольшими отличиями считаются выбросами, что позволяет избегать чрезмерного влияния краёв распределения, учитывая и систематическое отклонение результатов от истинного. В настоящей работе множитель правильности использован для оценки метрологических характеристик аналитических методик.

2) Показано, что наибольший вклад в дисперсию результата при определении соотношений элементов методом ЛИЭС БОС вносят неопределённость температуры и интенсивностей рассматриваемой пары эмиссионных линий (примерно по 40 %). Оставшаяся часть погрешности обусловлена неопределённостью вероятностей соответствующих переходов. Вклад электронной плотности пренебрежимо мал по сравнению с другими слагаемыми. Проведённый систематический анализ правильности при элементном анализе морского зоопланктона методом ЛИЭС позволил предложить способы прямого полуколичественного определения Li, B, Na, Mg, P, K, Ca и Sr.

3) Установлено, что сочетание ЛИЭС и спектроскопии комбинационного рассеяния света с методами анализа многомерных данных (метод главных компонент, неотрицательное матричное разложение и др.) приводит к кластеризации образцов зоопланктона соответственно биологическим таксонам (значение силуэта равно 0.38 для неотрицательного матричного разложения). При этом эмиссионные спектры оказались гораздо

более чувствительны к таксономическим различиям, чем спектры комбинационного рассеяния.

4) Показана эффективность обработки объединенных данных ЛИЭС и СКР света с помощью алгоритмов хемометрики (неотрицательное матричное разложение и варианты анализа общих компонент и удельных весов на основе метода главных компонент и анализа независимых компонент, а также силуэтная метрика) для выявления взаимосвязей между элементным и молекулярным составом зоопланктона. Найденные корреляции между сигналами воспроизводятся при использовании всех применённых алгоритмов, что указывает на универсальность подхода и его потенциальную применимость к другим типам биологических объектов. В разложениях матриц спектров зоопланктона всегда наблюдается не менее двух компонент, содержащих сигналы лития. В большинстве случаев одна из этих компонент содержит также сигналы комбинационного рассеяния каротиноидов, другая — сигналы аминокислот (прежде всего триптофана). Обнаружена сильная парная корреляция между интенсивностями сигналов лития в спектрах лазерно-индуцированной плазмы и триптофана в спектрах комбинационного рассеяния для образцов с умеренным содержанием лития (до 70 мкг/г).

Практическая значимость:

В настоящей работе образцы морского зоопланктона были впервые охарактеризованы методами ЛИЭС и спектроскопии комбинационного рассеяния света. Показана возможность прямого полуколичественного определения Li, B, Na, Mg, P, K, Ca и Sr в зоопланктоне методом ЛИЭС, в том числе без образцов сравнения. Предложена метрика для оценки качества результатов анализа — множитель правильности. Показана эффективность математических алгоритмов обработки многомерных данных (прежде всего метода главных компонент и неотрицательного матричного разложения) для биологически осмысленной кластеризации образцов зоопланктона на основе спектров лазерно-индуцированной плазмы и комбинационного рассеяния. Это важно в контексте методической проблемы разделения смешанной (тотальной) планктонной пробы на отдельные виды планктонных организмов, до настоящего времени не получившей однозначного решения. Применение относительно редко используемых в аналитической химии алгоритмов, таких как неотрицательное матричное разложение и варианты анализа общих компонент и удельных весов на основе метода главных компонент и анализа независимых компонент, позволило предложить способы выявления корреляций между элементным и молекулярным составом анализируемых образцов на основе их спектров лазерно-индуцированной плазмы и комбинационного рассеяния. Представленное сочетание методов позволит глубже понять взаимосвязи элементного и молекулярного состава

тканей животных и может быть использовано как удобный и доступный инструмент изучения биохимических процессов — в частности, для установления причин и механизма аномального накопления лития планктонными организмами. Результаты исследования в части разработки способов определения элементного состава биологических тканей без образцов сравнения могут быть применены для полуколичественного анализа зоопланктона на борту научно-исследовательских судов.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Учёт результатов моделирования спектров плазменного источника в состоянии локального термодинамического равновесия при выборе экспериментальных условий (испарение ультрафиолетовым лазерным пучком с энергией импульса 19–25 мДж, усреднение спектров не менее чем от 5 точек на поверхности образца с накоплением сигнала от 5–11 импульсов) позволяет найти аналитические линии, свободные от самопоглощения и спектральных помех, для определения Li, B, Na, Mg, P, K, Ca и Sr в образцах животных и растительных тканей методом ЛИЭС как с использованием метода внешних стандартов, так и без образцов сравнения при наблюдении плазмы с оптимальными временными параметрами.
2. ЛИЭС без образцов сравнения позволяет проводить полуколичественное (относительная погрешность 30–80 %) определение соотношений элементов в зоопланктоне при учёте вариаций температуры и электронной плотности в различных зонах лазерно-индуцированной плазмы.
3. Предложенная для интегральной оценки величины систематической погрешности метрика – множитель правильности, – показывающая степень отклонения совокупности экспериментальных результатов от истинных значений, делает более удобным сравнение между собой результатов анализа различных образцов и групп образцов.
4. Применение метода главных компонент и неотрицательного матричного разложения к данным ЛИЭС и спектроскопии комбинационного рассеяния света позволяет выделить особенности химического состава изученных образцов зоопланктона.
5. Анализ общих компонент и удельных весов, метод главных компонент и неотрицательное матричное разложение позволяют выявить корреляции между особенностями элементного (прежде всего Li) и молекулярного состава зоопланктона по спектрам лазерно-индуцированной плазмы и комбинационного рассеяния, при этом выявленные зависимости сохраняются и при исключении собственно линий лития из рассматриваемого набора спектральных данных.

Степень достоверности:

Достоверность получаемых результатов обеспечивалась анализом стандартных образцов химического состава, а также использованием современных средств обработки экспериментальных данных и применением современного спектроскопического оборудования.

Соответствие паспорту научной специальности:

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.4.2. Аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (атомная и молекулярная спектроскопия); методическое и математическое обеспечение химического анализа; анализ органических веществ и материалов; анализ объектов окружающей среды.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: на Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017 г.), XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2018" (Москва, МГУ, 2018 г.), IX Международной конференции «Физика плазмы и плазменные технологии» (Минск, Беларусь, 2018 г.), 10-м Европейском симпозиуме по лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии "EMSLIBS-2019" (Брно, Чехия, 2019 г.), конференции SciX-2019 (Палм-Спрингс, США, 2019 г.), 12-ом Зимнем симпозиуме по хемометрике ("WSC-12") «Современные методы анализа данных» (Саратов, 2020 г.), конференции LIBS-2020 (Киото, Япония, 2020 г.), конференции International Workshop on Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (Сегед, Венгрия, 2020 г.), 11-м Европейском симпозиуме по лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии "EMSLIBS-2021" (Гихон, Испания, 2021 г.), 13-ом Зимнем симпозиуме по хемометрике "WSC-13" (Москва, 2022 г.), X Международной конференции «Физика плазмы и плазменные технологии» (Минск, Беларусь, 2022 г.), конференции "ICAMDATA-12" (Mola di Bari, Италия, 2022 г.) и 14-ом Зимнем симпозиуме по хемометрике "WSC-14" (Цахкадзор, Армения, 2024 г.). Всего опубликовано 17 текстов тезисов докладов.

Публикации.

По теме диссертации опубликованы 5 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и

рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

Личный вклад автора:

Личный вклад автора заключался в поиске и анализе литературы по теме работы, проведении экспериментов и обработке их результатов, а также в подготовке текстов публикаций (при участии соавторов). Во всех опубликованных по теме диссертации работах вклад автора является определяющим.

Структура и объём работы:

Работа состоит из введения, списка сокращений, трёх глав, заключения и выводов, благодарностей, библиографии и приложения. Общий объём работы 328 тыс. знаков на 154 страницах, включая 38 рисунков, 18 таблиц, список литературы из 301 наименования и 15 страниц приложений.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности лазерно-индуцированной плазмы в качестве источника излучения для спектрального анализа

1.1.1. Лазерная абляция и образование плазмы

Абляция — совокупность физико-химических процессов, результатом которых является удаление вещества с поверхности или из объёма твёрдого тела (от лат. *ablatio* — отнятие, устранение) [6]. Лазерная абляция характеризуется следующими характерными чертами. Она, во-первых, непосредственно связана с поглощением энергии лазера мишенью; во-вторых, абляция протекает без участия вещества окружающей среды, в отличие от лазерно-индуцированного химического травления; в-третьих, её результатом является образование парогазового (или пароплазменного) облака продуктов абляции. Лазерная абляция носит пороговый характер, т.е. заметное удаление вещества происходит лишь при достижении некоторой плотности мощности излучения [6,7].

Если время воздействия лазера существенно больше, чем время установления равновесия между электронами и более тяжёлыми частицами, то происходит плавление вещества. В этом случае процесс хорошо описывается тепловой моделью [6], предполагающей испарение мишени вследствие нагревания её поверхности лазером. При использовании лазерной абляции для отбора пробы (лазерный пробоотбор) работают в режиме развитой абляции, когда доза облучения превышает пороговую в 2.5–5 раз. Этот режим характеризуется уже линейной зависимостью массы испарённого вещества от дозы облучения, следующей из закона сохранения энергии. Поскольку при испарении в приповерхностном слое растёт давление, существенно превышающее давление окружающего газа, образуется быстро расширяющееся облако продуктов абляции, которое может частично ионизоваться. В результате ускорения электронов под воздействием лазерного излучения и лавинной ионизации образуется плазма, которая закрывает поверхность мишени от заднего фронта лазерного импульса. В силу этого обстоятельства зависимость толщины удаляемого слоя от дозы становится логарифмической. Поглощение света плазмой тем сильнее, чем больше длина его волны.

Первая стадия абляции — поглощение энергии излучения электронами. Электроны могут покинуть поверхность, если их энергия будет для этого достаточна, или отдать избыточную энергию адсорбированным атомам или молекулам [8] (на этом основан метод матрично-активированной лазерной десорбции и ионизации, МАЛДИ).

Для субпикосекундных импульсов тепловая модель абляции уже не работает [9], так как за время действия импульса не происходит термализации энергии, поглощенной

электронами (в этом случае используется двухтемпературная модель). Соответственно, поступательная температура электронов намного выше температуры решётки, а движением вещества в масштабах длительности импульса можно пренебречь. Пароплазменное облако также образуется после окончания импульса и не влияет на процесс абляции.

Предложен также механизм т.н. фотофизической лазерной абляции, учитывающий электронное возбуждение сложных органических молекул. Он представляет интерес при рассмотрении абляции органических материалов. Показано, что при возбуждении молекул мишени лазерным излучением изменяется энергия активации для их удаления из конденсированной фазы, а эффективность абляции существенно возрастает по сравнению с термическим механизмом [10].

При больших плотностях мощности излучения (порядка 20 ГВт/см²) может происходить перегрев расплава и взрывное кипение. Кратеры, остающиеся на поверхности, получаются гораздо глубже, чем в режиме стационарного испарения [8].

При пикосекундной абляции на воздухе [11], когда плотность мощности излучения достигает единиц ТВт/см², может происходить очень быстрое образование лазерного факела (за время порядка 0.1 нс) вследствие образования т.н. электронной плазмы. Интересной особенностью образование плазмы конической формы — в отличие от полусферической плазмы при воздействии наносекундных импульсов. Электронная плазма может поглотить в существенной степени поглотить фронт лазерного импульса и снизить эффективность абляции.

Лазерный пробоотбор (отдельно от образования плазмы) реализуется в таких аналитических методах, как масс-спектрометрия или атомно-эмиссионная спектроскопия в индуктивно-связанной плазме после лазерной абляции (ЛА-ИСП-МС, ЛА-ИСП-АЭС).

Уменьшение длины волны приводит к росту влияния фотоиндуцированных процессов, снижению порога пробоя и экранировки поверхности образца плазмой, что увеличивает скорость абляции и уменьшает эффект фракционирования (изменение состава плазмы по сравнению с составом мишени в силу неодинаковых теплофизических свойств элементов мишени), поскольку роль термических процессов уменьшается [12]. Было обнаружено, что фракционирование уменьшается с ростом дозы облучения [13]: при абляции стекла ($\lambda = 266$ нм) соотношение Pb/U падало при увеличении мощности, пока не сравнялось с составом твёрдой фазы при $F = 0.6$ ГВт/см²; дальнейшее увеличение мощности не вызывало существенных изменений.

Важным параметром является длительность лазерного импульса, которая может находиться в нано-, пико- или фемтосекундном диапазоне, что определяет характер

взаимодействия излучения как с веществом, так и с образующейся плазмой. При тепловом механизме абляции форма кратера определяется наличием расплава. Напротив, при фемтосекундной абляции, когда плавления вещества не происходит за время воздействия импульса, кратеры имеют форму, напоминающую скважину с вертикальными стенками без наплывов по краям [14]. Фемтосекундная ЛИЭС, по сравнению с наносекундной, характеризуется более низкими порогами абляции, меньшим повреждением образца и лучшим пространственным разрешением, что важно при работе с биоматериалами [15–17].

Образование лазерной плазмы в диэлектриках (в том числе и биологических тканях) можно рассмотреть на примере чистой воды, которую можно считать полупроводником с энергией возбуждения проводимости $\Delta E = 6.5$ эВ [18]. Излучение лазера вызывает появление электронов, условно называемых свободными. В соответствии со значением ΔE , для появления свободного электрона необходим квант излучения с длиной волны $\lambda = \Delta E/hc = 191$ нм. Если излучение имеет бóльшую длину волны, переход электрона в зону проводимости может происходить в результате многофотонного поглощения.

Свободные электроны могут поглощать излучение в рамках нерезонансного процесса, носящего название обратного тормозного поглощения (ОТП), которое заключается в передаче энергии фотона свободному электрону в поле заряженной частицы [19]. Ускоренные до энергии ионизации электроны могут ионизовать атомы и молекулы по ударному механизму; при достаточной мощности импульса поглощение энергии электронами и появление новых электронов происходит быстрее, чем потеря энергии при столкновениях с другими частицами или при выходе электронов из фокального объёма, что приводит к лавинной, или каскадной, ионизации.

Многофотонная ионизация происходит в течение фемтосекунд, и её скорость, естественно, не зависит от концентрации свободных электронов. Лавинная ионизация, наоборот, от этой концентрации зависит и занимает большее время, так как свободному электрону нужно последовательно поглотить несколько квантов излучения, прежде чем он приобретёт энергию, превышающую ΔE , для чего нужно столько же столкновений с тяжёлыми частицами. Лавинная ионизация вносит бóльший вклад в электронную плотность, чем многофотонная.

В прозрачных средах плазма образуется везде, где плотность мощности излучения превышает порог пробоя [20]. Пороги пробоя составляют 33–40 кДж/см³ для

наносекундных импульсов, около 10 кДж/см^3 для пикосекундных импульсов и менее 1 кДж/см^3 для фемтосекундных импульсов [20–22].

Отражательная способность плазмы зависит от её электронной плотности и резко возрастает, когда плазменная длина волны $\lambda_{\text{пл}}$, пропорциональная $1/\sqrt{N_e}$, становится меньше длины волны падающего излучения. Например, для $N_e = 10^{21} \text{ см}^{-3}$ $\lambda_{\text{пл}}$ составляет 1057 нм , поэтому, например, излучение фундаментальной гармоники АИГ:Nd³⁺ лазера будет в значительной степени отражаться от плазмы с такой электронной плотностью [19].

Стоит отметить, что при пробое в жидкой воде до 90 % энергии наносекундного импульса переходит в механическую энергию ударной волны и кавитационных пузырьков, в то время как для пикосекундных импульсов эта доля существенно меньше [23].

1.1.2. Свойства и параметры лазерно-индуцированной плазмы

Температура является мерой средней энергии частиц, составляющих объект. Плазма, особенно лазерно-индуцированная, представляет собой объект, состоящий из частиц различной природы: атомов, ионов, электронов и молекул. Все эти частицы обладают кинетической энергией, соответствующей определённой температуре (*поступательная температура*). В частности, для одноатомного идеального газа можно записать такое выражение [24,25]:

$$E_k = \frac{1}{2} m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} kT. \quad (1)$$

Здесь m — масса частицы, $\langle v^2 \rangle$ — средний квадрат её скорости, k — постоянная Больцмана ($1.38 \times 10^{-23} \text{ Дж/К}$), T — температура.

Равновесие ионизации описывается уравнением Саха, которое содержит *температуру ионизации*:

$$\frac{n_{q+1} n_e}{n_q} = \left(\frac{2Z_{q+1}}{Z_q} \right) \left(\frac{(2\pi m_e k)^{\frac{1}{2}}}{h} \right)^3 T^{\frac{3}{2}} \exp\left(\frac{-E_{\text{ион}}}{kT} \right), \quad (2)$$

где n — объёмная концентрация частиц с зарядами q и $q+1$, n_e — электронная плотность, $E_{\text{ион}}$ — энергия ионизации, а Z — сумма по состояниям

$$Z = \sum_i g_i \exp\left(\frac{-E_i}{kT} \right), \quad (3)$$

где g_i — статистический вес, E_i — энергии уровней.

Соотношение интенсивностей излучательных переходов между энергетическими уровнями атомов, молекул и ионов зависит от *температуры возбуждения*. При этом предполагается, что уровни заселяются в соответствии с распределением Больцмана.

$$I \propto Ah\nu n_m, \quad (4)$$

$$\frac{n_m}{n_k} = \frac{g_m \exp\left(\frac{-E_m}{kT}\right)}{g_k \exp\left(\frac{-E_k}{kT}\right)}. \quad (5)$$

Здесь I — интенсивность перехода, h — постоянная Планка (6.626×10^{-23} Дж \times с), ν — частота перехода (с^{-1}), A — коэффициент Эйнштейна для спонтанного испускания, m и k — обозначения верхнего и нижнего уровней перехода, соответственно.

Для описания колебательно-вращательных (КВ) спектров используются молекулярные константы [26]:

$$I_i \propto \nu^4 \phi \exp\left[-\frac{hcF(n', v', J')}{k_B T}\right] \quad (6)$$

$$F = T_e + \omega_e \left(v + \frac{1}{2}\right) - \omega_e x_e \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 + \dots + \\ + B_v J(J+1) - D_v J^2(J+1)^2 + H_v J^3(J+1)^3 + \dots, \quad (7)$$

где $T_e T_e$ — энергия электронного уровня молекулы, которому принадлежит данная КВ структура, $\omega_e \omega_e$ и $\omega_e x_e \omega_e x_e$ — колебательные постоянные, $B_v, D_v, H_v \dots B_v, D_v$ и H_v — вращательные постоянные, v — колебательное квантовое число, n', v', J' — соответственно электронное, колебательное и вращательное квантовое число начального состояния перехода, ϕ — произведение членов, описывающих вероятность перехода (факторы Франка — Кондона и Хёнля — Лондона), а c — скорость света.

Для описания плазмы, как правило, используют приближение локального термодинамического равновесия (ЛТР). Оно предполагает, что равновесие существует в границах небольших элементов объёма плазмы и устанавливается за время, много меньшее, чем характерное время изменения параметров плазмы. При этом предполагается, что частицы в пределах элемента испытывают достаточное число столкновений, необходимых для обмена энергией и установления равновесия [24]. Исходя из этого, сформулирован необходимый (но не достаточный) критерий существования ЛТР — т.н. критерий Мак-Виртера для электронной плотности (N_e) [27]:

$$N_e > \frac{2.55 \times 10^{11}}{\langle \bar{g} \rangle} T^{\frac{1}{2}} (\Delta E)^3. \quad (8)$$

Здесь T выражена в K , $\langle \bar{g} \rangle$ — безразмерный фактор Гаунта, ΔE — разность энергий начального и конечного уровня перехода (в эВ). Смысл выражения (8) состоит в том, что при данной электронной плотности скорость столкновительных процессов возбуждения и дезактивации по крайней мере на порядок выше скорости излучательных процессов [28]. Если столкновительные механизмы преобладают для всех переходов, можно говорить об ЛТР. Если это верно только для ограниченного числа переходов (с небольшими ΔE), ЛТР считается *частичным*.

При расширении и охлаждении плазмы происходит рекомбинация электронов и ионов (это происходит в результате тройных столкновений между двумя электронами и одним ионом). Потерю энергии в виде излучения представляют как:

$$\frac{4\pi I}{h\nu\Phi} = |\Delta N_e|Nk + AN^*. \quad (9)$$

Здесь N и N^* — концентрации тяжёлых частиц в основном и возбуждённом состоянии, соответственно, а k — константа скорости столкновительной дезактивации. В соответствии с этим уравнением в начале существования плазмы, когда электронная плотность быстро падает, доминирующим механизмом эмиссии является столкновительная дезактивация [28].

В состоянии ЛТР спектральную яркость плазмы с учётом поглощения можно записать следующим образом [29,30]:

$$B_\lambda = B_\lambda^0(1 - e^{-\alpha(\lambda)L}), \quad (10)$$

где B_λ^0 — спектральная яркость абсолютно чёрного тела, L — размер плазмы вдоль линии обзора, α — коэффициент поглощения. Наблюдаемый профиль спектральной линии формируется в результате совместного действия различных механизмов уширения и свёртки с инструментальной функцией. В зависимости от вклада одного или другого фактора форму профиля, как правило, описывают функциями Лоренца, Гаусса или Фойгта.

Интенсивность излучения оптически толстой плазмы даётся соотношением

$$I(\lambda) = \int_0^\infty P(\lambda - \lambda')B_\lambda d\lambda'. \quad (11)$$

Здесь P — профиль спектральной линии, определяемый вышеупомянутыми механизмами.

1.1.3. Формирование лазерно-индуцированной плазмы и аналитического сигнала. Оборудование

Лазерно-искровая эмиссионная спектрометрия (ЛИЭС) — метод атомно-эмиссионной спектроскопии, основанный на наблюдении излучения лазерно-индуцированной плазмы (ЛИП). При этом ЛИП выступает одновременно и в качестве атомизатора, и в качестве источника излучения. ЛИЭС была впервые предложена в 1962 г. [31], вскоре после появления самих лазеров (1960 г. [32]), и получила серьёзное развитие начиная с 1990-х гг., когда существенно расширились технические возможности регистрации спектров короткоживущих источников излучения.

Принцип ЛИЭС заключается в том, что мощное излучение лазера, сфокусированное на поверхность образца (плотность мощности измеряется гигаваттами на квадратный сантиметр), приводит к испарению небольшого количества материала, его атомизации и возбуждению (совокупность множества протекающих при этом физических и химических процессов называют лазерной абляцией) [33]. Образуется ЛИП, время жизни которой зависит от мощности и длительности лазерного импульса. При использовании наиболее распространённых наносекундных лазеров оно составляет величину порядка 100 мкс. ЛИП претерпевает быстрые превращения, для наблюдения за которыми нужны высокоскоростные регистрирующие системы. На ранних временах жизни плазмы (в случае наносекундных лазеров — до 0.1 мкс после импульса) в её спектре преобладает континуум, складывающийся из тормозного излучения электронов и сильно уширенных вследствие эффекта Штарка атомных линий. Высокая плотность заряженных частиц вызывает значительное снижение энергии ионизации, что приводит к уменьшению количества уровней, между которыми могут происходить переходы. Вследствие этого спектр плазмы на ранних временах жизни беден линиями и малоинформативен [28]. По мере расширения и охлаждения плазмы интенсивность фона падает, а в спектре начинают доминировать эмиссионные линии атомов. Этот временной отрезок, как правило, наиболее благоприятен для проведения элементного анализа. Излучение плазмы регистрируют спектрометрами различной конструкции, оснащённых линейными или матричными детекторами (КМОП, ПЗС) [33–35]. Использование стробируемых детекторов позволяет обеспечивать оптимальные временные параметры регистрации как при аналитических измерениях, так и получить информацию о «мгновенном» состоянии плазмы, когда имеет смысл измерение и обсуждение её параметров — в первую очередь, температуры и электронной плотности.

Наконец, на поздних временах жизни плазмы завершается рекомбинация ионов и электронов, атомы объединяются в молекулы, а молекулы, в зависимости от своей

химической природы, могут объединиться в кластеры. Существование плазмы прекращается.

Основные параметры лазеров в ЛИЭС — энергия и длительность импульсов, длина волны излучения, модовая структура [34,36,37]. Самый распространённый тип лазеров в ЛИЭС — импульсный твердотельный лазер на кристалле иттрий-алюминиевого граната, допированного неодимом, с модуляцией добротности (АИГ:Nd³⁺, англ. Nd:YAG, $\lambda = 1064$ нм, длительность импульса (τ) – 2–20 нс) [38], который при фокусировке позволяет достигать плотность мощности в сотни ГВт/см² и выше. Также не представляет больших трудностей генерация гармоник более высокого порядка, со второй по пятую (532, 355, 266 и 213 нм, соответственно), с помощью нелинейных кристаллов [39]. Кроме того, в ЛИЭС встречается использование Nd:YVO₄ лазеров ($\lambda = 1064$ нм), СО₂-лазеров (10.6 мкм), а также эксимерных лазеров (ArF, $\lambda = 193$ нм; KrF, 248 нм). Лазеры с газообразными рабочими телами менее распространены из-за более сложного обслуживания.

Фемтосекундные лазеры (титан-сапфировые) позволяют добиться очень малых размеров кратеров (и, соответственно, разрешения), а также позволяют избежать взаимодействия лазерного факела с излучением. Однако эти же причины обуславливают малое

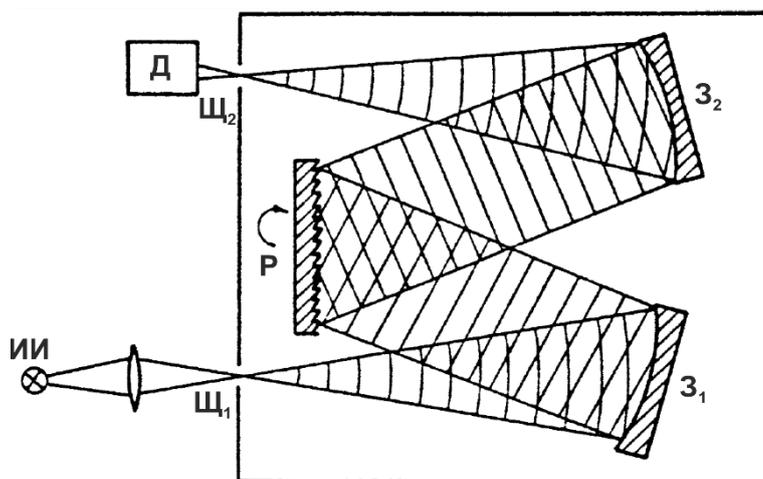


Рис. 1.1. Схема спектрографа Черни–Тёрнера (вид сверху). ИИ — источник излучения, Щ₁ и Щ₂ — входная и выходная щели, З₁ — зеркало-коллиматор, З₂ — зеркало-объектив, Р — дифракционная решётка, Д — детектор [40].

время жизни фемтосекундной плазмы и меньшую интенсивность спектров [15].

Для получения спектра нужна диспергирующая система. Чаще всего в ЛИЭС используют спектрографы, позволяющие наблюдать спектр плазмы в относительно широком спектральном

диапазоне (от нескольких до десятков нанометров). Наиболее распространённой конструкцией является спектрограф Черни–Тёрнера (Рисунок 1.1) [40]. Центральная длина волны наблюдаемого спектрального промежутка зависит от угла поворота дифракционной решётки [41], а ширина — от плотности штрихов на решётке и фокусного расстояния спектрографа, т.е. параметров, определяющих спектральное разрешение. Чем больше разрешение, тем меньше наблюдаемый диапазон, и наоборот. Обычно ширина

диапазона не превышает 100 нм [42]. Также широко используются эшелле-спектрометры со скрещённой дисперсией, позволяющие одновременно регистрировать весь оптический диапазон с хорошим спектральным разрешением благодаря развёртке многих порядков дифракции на матричном детекторе. Недостатком такой схемы является сравнительно низкая светосила. Спектрометры Пашена-Рунге имеют несколько выходных щелей для выделения из спектра нескольких определённых длин волн; в ЛИЭС в настоящее время, как правило, по кругу Роуланда устанавливают несколько линейных детекторов [43].

Монохроматоры, как правило, оснащаются фотоэлектронными умножителями (ФЭУ), имеющими коэффициент усиления до 10^6 и время отклика менее 1 нс, что позволяет наблюдать лазерную плазму с высоким временным разрешением [33]. Двухмерные детекторы позволяют изучать не только распределение энергии по длинам волн, но и получать информацию о пространственном распределении сигнала в источнике излучения. ПЗС и КМОП-матрицы, в отличие от ФЭУ, требуют заметного времени для считывания сигнала, поэтому они малоприспособлены для изучения процессов в лазерной плазме. Эта проблема решается с помощью усилителей яркости, или электрооптических преобразователей (ЭОП). ЭОП состоит из фотокада, микроканальной пластины (МКП), которая обеспечивает стробирование и усиление сигнала в зависимости от прикладываемого к ней потенциала [44]. Детекторы с усилителями яркости позволяют реализовать еще один важный режим работы – накопление сигнала на матрице от многих импульсов в результате синхронизованной с лазером работы ЭОП. Для ЛИЭС важна возможность накопления сигнала от многих актов образования плазмы, поскольку позволяет улучшить соотношение сигнала и шума, считывая сигнал только после того, как оно достигнет желаемого уровня.

Ещё один тип детекторов, который получил некоторое распространение в ЛИЭС, — ПЗС с умножением электронов (т.н. EMCCD от англ. *electron-multiplying CCD*), однако здесь существенной проблемой является отклонение отклика от линейной зависимости, а также и очень большая чувствительность к темновому току, что делает эти камеры эффективными только в условиях охлаждения (до -70 °C) [36,44,45].

1.1.4. Диагностика плазмы

В ЛИЭС, как для аналитических целей, так и при решении других задач, часто приходится проводить диагностику плазмы — прежде всего определение температуры и электронной плотности.

Существует несколько способов определения температуры плазмы [24]. Один из них предполагает *измерение профилей доплеровского уширения* спектральных линий. Как известно, $w_D = 7.16 \times 10^{-7} \lambda \sqrt{\frac{T}{M}}$, где λ — длина волны в Å, а M — атомная масса элемента в г/моль. Однако на практике этот способ применять сложно из-за относительно низких температур в плазменных источниках, используемых для аналитических приложений. Более того, из-за значительного уширения линий вследствие эффекта Штарка профили линий, наблюдаемых в ЛИС, представляют собой свёртку гауссова и лоренцева контуров со значительным преобладанием последнего.

Наибольшее распространение для определения температуры получил *метод графиков Больцмана*. Как известно, интенсивность излучения ($\text{Вт/ср}\cdot\text{см}^2$) спонтанного испускания может быть рассчитана из следующего уравнения [25]:

$$I = \Phi \left(\frac{hc g_k AN}{4\pi \lambda Z(T)} \right) \exp\left(\frac{-E_k}{kT}\right), \quad (12)$$

где Φ — параметр, зависящий от условий сбора излучения, c — скорость света (м/с), g — статистический вес верхнего уровня, A — вероятность перехода (с^{-1}), N — количество рассматриваемых частиц, E_k — энергия верхнего уровня (эВ).

После логарифмирования получим

$$\ln \frac{I\lambda}{gA} = \ln \left(\frac{\Phi hc N}{4\pi Z} \right) - \frac{E}{kT}. \quad (13)$$

Это — уравнение линейной функции $\ln \frac{I\lambda}{gA}$ от E с наклоном $-\frac{1}{kT}$. Значения E (энергия верхнего уровня), g и A известны из справочников (например, [46]) или спектроскопических баз данных (NIST [47], Kurucz [48]). Наклон прямой позволяет определить температуру, а из величины отсекаемого отрезка на оси Y — концентрацию элемента (при учёте эффективности сбора излучения).

Существует обобщение описанного подхода с учётом ионизационного равновесия (уравнение Саха), что позволяет использовать данные для атомных и ионных линий одновременно и описывать их единой зависимостью — *графиком Саха — Больцмана*.

Если выразить из уравнения Саха n_{q+1} и подставить его в уравнение для интенсивности, получим [49]

$$\ln \frac{I\lambda}{gA} - (q+1) \ln \left[2 \left(\frac{mk}{2\pi\hbar^2} \right)^{3/2} \frac{T^{3/2}}{N_e} \right] = \ln \left(\frac{\Phi hc N}{4\pi Z} \right) - \frac{E^*}{kT}. \quad (14)$$

Здесь E^* — сумма энергии верхнего уровня перехода и энергий ионизации. Хотя обе части уравнения содержат неизвестную температуру, решение быстро сходится при расчёте методом итераций [50]. Для мишени известного состава можно использовать линии нескольких элементов, предполагая, что состав плазмы отражает состав образца.

Частный случай графика Больцмана представляет собой *метод двух линий* (или пары линий), когда для построения графика берут всего две точки, так что температура вычисляется простыми арифметическими действиями [51]:

$$T = \frac{|E_2 - E_1|}{k} \left(\ln \frac{A_2 g_2 I_1 \lambda_1}{A_1 g_1 I_2 \lambda_2} \right)^{-1}. \quad (15)$$

Погрешность $\left(\frac{\Delta T}{T}\right)$ можно вычислить, воспользовавшись законом распространения неопределённости для функции нескольких переменных:

$$\frac{\Delta T}{T} = \left| \frac{kT}{E_2 - E_1} \right| \sqrt{\left(\frac{\Delta I_1}{I_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta I_2}{I_2}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_1}{A_1}\right)^2 + \left(\frac{\Delta A_2}{A_2}\right)^2}. \quad (16)$$

Метод пары линий удобен своей простотой. Из последнего уравнения следует, что погрешность температуры тем меньше, чем больше разность энергий верхних уровней рассматриваемых переходов. На практике пару линий выбирают так, чтобы эта разность была не менее 0.5 эВ (ок. 4000 см⁻¹). Для графика Больцмана разность энергий достигает нескольких эВ, а для метода Саха–Больцмана она может достигать до 10 эВ, поэтому при $\Delta I/I$ порядка 10 % (в т.ч. в результате самопоглощения) $\Delta T/T$ будет порядка 1 %, что является очень хорошим результатом.

Если в излучении плазмы обнаружены полосы двухатомных молекул, то их также можно использовать для определения температуры. При этом следует помнить, что в высокотемпературных источниках света молекулы обычно диссоциированы и полосы излучаются только из более холодных областей источника.

Для колебательных полос имеет место правило сумм: сумма сил (т. е. величин I_i/v^4) всех полос с одним и тем же верхним состоянием (n', v') и одним и тем же электронным моментом перехода пропорциональна числу молекул в этом состоянии, т.е.

$$\sum_{v'} \frac{I_i}{v^4} \propto \exp \left[-\frac{hcF(n', v')}{k_B T} \right]. \quad (17)$$

Логарифмируя это выражение, получаем линейную зависимость левой части от $1/T$, откуда немедленно определяется температура (колебательная). Таким образом

можно определить T , имея в распоряжении, например, спектры фиолетовой системы CN при 372–388, 410–422 и 358–360 нм [26].

Другой путь — аппроксимация экспериментальных данных расчётным спектром молекулярной полосы с учётом аппаратной функции путём варьирования температуры. Кроме того, пользуются тем, что соотношения площадей разных частей наблюдаемого молекулярного спектра (например, полос, соответствующих разным колебательным числам) существенно изменяются в зависимости от температуры, и составляют соответствующие номограммы (по экспериментальным или расчётным данным). Такие номограммы позволяют быстро определить температуру.

Следует отметить, что все приведённые способы хорошо работают тогда, когда используемые линии свободны от спектральных наложений, а также от самопоглощения. Последнее обычно приводит к завышенной оценке температуры. Поэтому важно подбирать диагностические линии, мало подверженные самопоглощению, т. е. с относительно высоколежащим нижним уровнем перехода (для условий лазерной плазмы — порядка 2 эВ и выше) и малой силой осциллятора (порядка 10^{-3}). Для линий основных компонентов образца самопоглощение заведомо сильнее, чем для микрокомпонентов, поэтому с этими элементами нужно проявлять особенную осторожность. Простейшим способом оценки самопоглощения является анализ отношений интенсивности линий одного мультиплета, что, к сожалению, не всегда возможно. Экспериментально самопоглощение оценивают с помощью зеркала, установленного на оси сбора излучения за источником. Сравнение сигналов с зеркалом и без него позволяет рассчитать коэффициенты пропускания для спектральных линий. Кроме того, увеличение количества излучения, попадающего на детектор при такой оптической схеме, позволяет улучшить чувствительность анализа [52].

В работе [30] описан алгоритм моделирования лазерной плазмы, учитывающей доплеровское и штарковское уширения, самопоглощение линий, а также аппаратную функцию конкретного оборудования. Аппроксимация экспериментального спектра расчётным спектром позволяет надёжно определить одновременно и температуру, и электронную плотность, а также рассчитать степень самопоглощения для каждой линии. Более подробно эти вопросы рассмотрены в разделе 1.2.3.

Для *определения электронной плотности* в плазме чаще всего пользуются *эффектом Штарка*, названным по фамилии исследователя, обнаружившего его в 1913 г. [53]. В условиях плазменных источников этот эффект вызывает уширение и смещение эмиссионных линий. Величина эффекта Штарка сильно различается для разных

переходов, однако он больше выражен для переходов между уровнями с большими главными квантовыми числами. Для лазерной плазмы ($N_e \sim 10^{17} \text{ см}^{-3}$) штарковская ширина обычно составляет несколько десятков пикометров, сдвиг — единицы пикометров. Величина эффекта слабо зависит от температуры, поэтому в ЛИЭС этим обычно пренебрегают. Для водородоподобных атомов наблюдается линейный эффект Штарка и зависимость полной ширины на половине высоты w_s (нм) от N_e (см^{-3}) имеет следующий вид [54]:

$$w_s = \alpha(N_e)^{2/3}. \quad (18)$$

В частности, для бальмеровской линии водорода H_α при 656.279 нм $\alpha = 5.14 \times 10^{-12}$, что означает ширину 1.107 нм при $N_e = 10^{17} \text{ см}^{-3}$. Из этого понятно, почему линии водорода часто используют для диагностики плазмы: даже при значительной аппаратной функции такие большие уширения можно измерить с хорошей точностью. Недостаток их использования — высокий потенциал возбуждения (более 12 эВ), из-за которого они имеют низкую интенсивность уже на средних временах жизни плазмы (2–3 мкс после лазерного импульса). Кроме того, поскольку реальная плазма состоит из горячего ядра и более холодной оболочки, излучение таких трудновозбуждаемых линий будет в большей степени отражать состояние ядра, нежели состояние других частей факела.

Для неводородоподобных атомов наблюдается квадратичный эффект Штарка, характеризующийся линейной зависимостью от электронной плотности [55]:

$$w_s = 2w_e(T)10^{-16}N_e \times \{1 + 1.75(1 - 0.75R)A(T) N_e^{1/4}10^{-4}\}, \quad (19)$$

$$d_s = \left[\frac{d}{w} + 2.00A(T)(1 - 1.2R) \right] w \left(\frac{N_e}{10^{16}} \right), \text{ где } R = 0.0899N_e^{1/4}T^{-1/2}. \quad (20)$$

Понижающий коэффициент R отвечает за дебаевское экранирование заряда в плазме. Величина $A(T)$ соответствует уширению в поле ионов. Расчётные величины w_e и d/w даны в монографии Грима [55] и обобщены в базе Stark-B [56]. Во многих случаях параметрами A и R можно пренебречь, и тогда уширение и сдвиг оказываются прямо пропорциональны электронной плотности. Экспериментально полученные величины обобщены в серии обзоров, выпускаемых с 1970-х годов сотрудниками Белградской обсерватории [57].

Очевидный альтернативный способ оценки N_e — из соотношения интенсивностей атомной и ионной линии одного и того же элемента по уравнению Саха при известной температуре. При таком расчёте нужно иметь в виду, что погрешность электронной плотности будет определяться погрешностями всех входящих в уравнение

параметров (особенно T), так что такую оценку, скорее всего, можно будет считать лишь полуколичественной.

1.1.5. Особенности прямого анализа биологических материалов методом ЛИЭС

ЛИЭС применяется для анализа самых разнообразных объектов: от радиоактивных отходов до минералов на дне океана или на поверхности других планет [3]. В силу описанных выше преимуществ, ЛИЭС нашла применение и в исследовании объектов окружающей среды, в том числе биологических материалов [3,36]. Как известно, биологические материалы (за исключением так называемых обызвествлённых тканей, таких как кости или зубы) содержат большое количество воды (десять процентов по массе), что может приводить к значительному снижению интенсивности эмиссионного сигнала [58]. Структура биологических материалов очень сложна, и поэтому интенсивность сигнала атомной эмиссии может значительно варьироваться не только из-за изменений химического состава в зависимости от пространственной координаты, но и из-за матричных эффектов. Эти факторы приводят к более низкому отношению сигнал/шум и худшей воспроизводимости спектров по сравнению, например, с образцами металлов [59]. Высокая частота следования импульсов даёт возможность улучшить метрологические характеристики, накапливая сигнал от большого количества импульсов, если это позволяет сделать механические свойства образца.

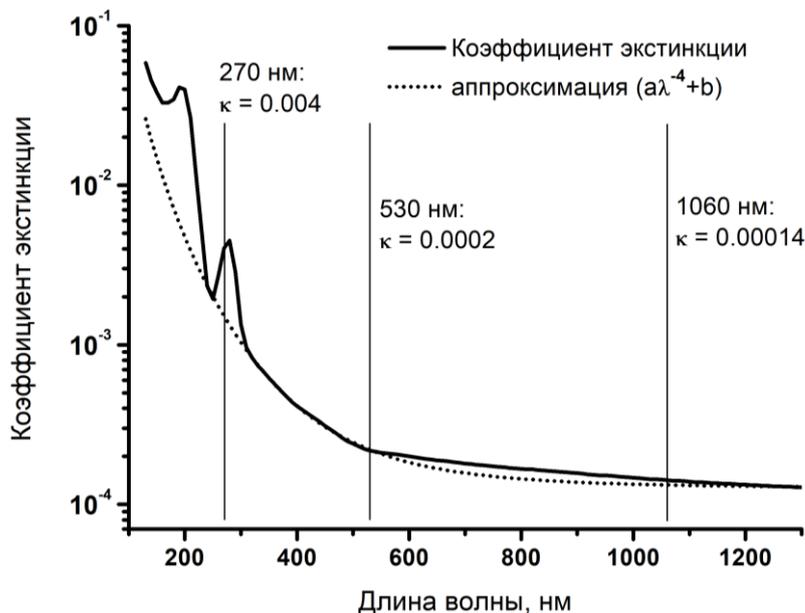


Рисунок 1.2. Коэффициент экстинкции овальбумина в зависимости от длины волны излучения [61].

Следует также обратить внимание на длину волны лазера, которая используется для создания плазмы. Во многих материалах коэффициент экстинкции быстро падает при увеличении длины волны в границах оптического диапазона [60]. Рисунок 1.2 иллюстрирует это поведение для овальбумина [61]. Чем больше

коэффициент, тем ниже порог абляции. Более коротковолновое излучение (в оптическом диапазоне) в целом поглощается эффективнее, чем относительно длинноволновое. Для овальбумина коэффициент экстинкции при 270 нм в 20 раз больше, чем при 530 нм,

и в 29 раз больше, чем при 1060 нм. Таким образом, излучение 4-й гармоники Nd:АИГ-лазера ($\lambda = 266$ нм) поглощается более чем на порядок лучше, чем в случае фундаментальной гармоники ($\lambda = 1064$ нм)¹. Это обстоятельство особенно важно для биологических образцов, которые легко повреждаются лазерными импульсами, поскольку для достижения желаемого отношения сигнал/шум потребуется накопить сигнал от меньшего числа импульсов. Увеличение энергии единичного импульса может иметь лишь ограниченный положительный эффект, так как усугубляет разрушение образца. Считается, что термические эффекты при взаимодействии с твёрдой мишенью менее выражены при использовании ультрафиолетовых лазеров [60]. С другой стороны, есть указания [63] на то, что плазма, индуцированная УФ-излучением, может иметь более низкую температуру, чем в случае ИК-лазеров. Это можно объяснить меньшей экранировкой поверхности плазмой и, соответственно, меньшему её разогреву УФ-излучением.

Кроме того, дифракционный предел, ограничивающий минимальный размер лазерного пятна, пропорционален длине волны излучения [63]; таким образом, с помощью УФ-лазера можно получить пятно меньшего диаметра и, следовательно, улучшение пространственного разрешения, что важно для картирования поверхностей. Поэтому многие серийные приборы оснащены Nd:YAG-лазерами, настроенными на длину волны 266 нм. Тем не менее, даже картирование часто проводят с помощью ИК-излучения [64].

Состав и морфология биологической ткани определяют её оптические свойства, влияющие на перераспределение энергии лазерного пучка в объёме вещества, от которого зависит протекание процесса абляции [65]. Биологическую ткань можно рассматривать как комплекс клеток и межклеточного вещества (МВ). Большую часть массы большинства мягких тканей составляет вода (55–99 %) и коллаген (0–35 %). В тканях типа печени и эпителия межклеточного вещества мало, и оно в основном представлено белками. Напротив, в тканях роговицы, хрящей, кожи доминирует МВ, при этом содержание коллагена может достигать до 35 %. В таких тканях почти вся вода удерживается полисахаридами в среде между коллагеновыми волокнами [21].

Поглощение в оптическом диапазоне связано с содержанием в ткани белков, ДНК, меланина, гемоглобина и воды (Рисунок 1.3). В УФ-диапазоне (180–400 нм) поглощают белки (особенно коллаген), ДНК и меланин. Поглощение тканей с высоким содержанием коллагена существенно уменьшается при увеличении длины волны. Соответственно, характеристическая длина оптического поглощения ($1/\mu_a$, где μ_a — коэффициент поглощения) увеличивается с ~ 0.5 мкм при $\lambda = 180$ нм до 200–400 мкм при $\lambda =$

¹ Интересно сравнить энергии квантов (4,67 и 1,17 эВ для $\lambda = 266$ и 1064 нм, соответственно) с энергиями связей C–C, C=C и C–H (3,61, 6,36 и 4,28 эВ соответственно) [62].

400 нм. Поглощение воды в ближней УФ-области пренебрежимо мало. Главный хромофор в УФ-диапазоне — пептидная связь (центральная длина волны поглощения соответствующего $n-\sigma^*$ перехода находится при 190 нм). Её вклад в общее поглощение (для человеческих тканей) остаётся существенным до $\lambda = 240$ нм [66]. Пик, соответствующий пуриновым и пиримидиновым основаниям ДНК, чрезвычайно интенсивен и находится в районе $\lambda = 260$ нм. Однако, если речь идёт о соединительных тканях, где содержание ДНК невысокое, поглощение в области 240–290 нм примерно в 100 раз ниже, чем при 190 нм. Сигнал поглощения меланина в человеческой коже становится заметен при 300 нм, затем наблюдается пик при 335 нм, после чего его сигнал монотонно убывает при увеличении длины волны [21,67].

В видимой области ($\lambda = 400-780$ нм) поглощение тканей зависит от меланина и гемоглобина. Восстановленная форма гемоглобина имеет максимумы поглощения при 433 и 556 нм, а окислённая — при 414, 542 и 576 нм. В ближней ИК-области ($\lambda = 0.78-15$ мкм) основные хромофоры — вода, гемоглобин и белки. Поглощение белков здесь, как и в УФ-области, снова обусловлено пептидными фрагментами [21].

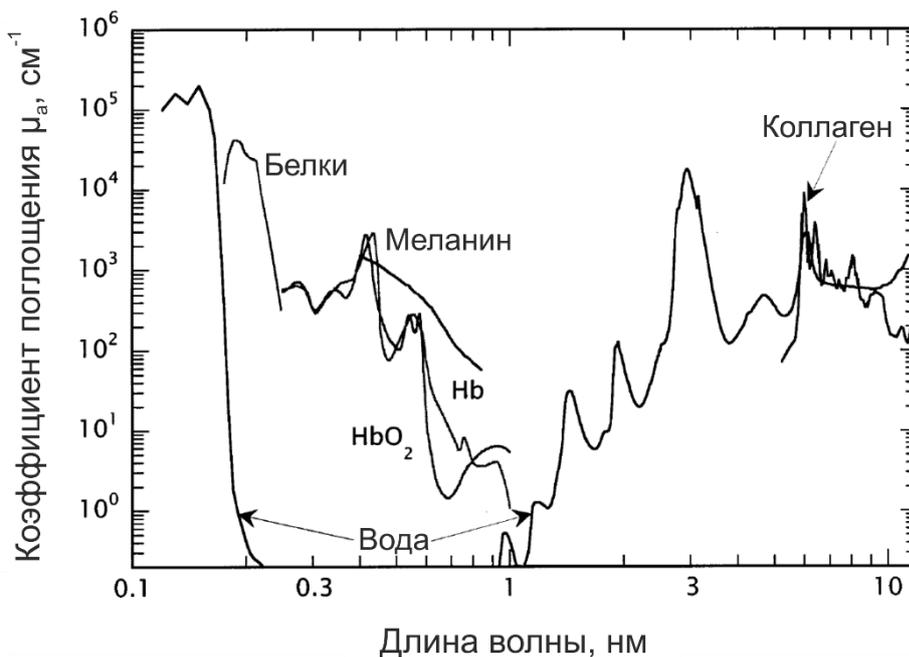


Рис. 1.3. Коэффициенты поглощения основных хромофоров биологических тканей в зависимости от длины волны [21].

Из приведённых данных следует, что влажные (нативные) ткани, содержащие много воды, должны характеризоваться наибольшим поглощением либо в дальней ИК-области, либо в области вакуумного ультрафиолета. Собственно органические молекулы, составляющие сухой остаток тканей, поглощают преимущественно в оптическом диапазоне, причём поглощение в целом убывает при увеличении λ от 200 до 1000 нм. Поэтому можно предположить, что при работе с животными тканями наиболее

эффективны УФ-лазеры на границе ближнего и дальнего УФ-диапазонов, например, ArF-лазер (193 нм) или 4-я и 5-я гармоники Nd:АИГ-лазера ($\lambda = 266$ и 213 нм, соответственно).

В отсутствие рассеяния глубина проникновения излучения в ткань обратно пропорциональна коэффициенту поглощения (выполняется закон Бера–Ламберта). Если рассеяние значительно (что характерно для большинства тканей), глубина проникновения уменьшается и начинает зависеть также и от диаметра лазерного луча: чем меньше диаметр, тем меньше и глубина проникновения [68]. Для человеческой кожи рассеяние значительно преобладает над поглощением на участке между $\lambda = 450$ и 1750 нм. Использование излучения с такой длиной волны, при которой происходит значительное рассеяние, снижает воспроизводимость абляции [21].

Нужно иметь в виду, что данные по оптическим свойствам тканей получены для обычных температур и освещённостей, близких к физиологическим условиям. Луч мощного импульсного лазера может приводить к разнообразным нелинейным эффектам при взаимодействии с веществом. Например, для ИК-излучения, взаимодействующего с водородными связями в мишени, коэффициент поглощения зависит от температуры мишени и может существенно изменяться при увеличении плотности энергии излучения в объёме вещества [69].

Энергию лазерного излучения можно считать сконцентрированной в определённом объёме материала мишени, когда длительность импульса не превосходит характерного времени рассеяния тепла, равного $1/k\mu_a^2$, где k — коэффициент температуропроводности. Например, коллагеновые волокна в роговице и коже имеют характерные времена рассеяния тепла 6.3 и 69 нс, соответственно (в силу различий в размерах). Поэтому при абляции кожи наносекундным лазером можно говорить об удерживании тепла в ограниченном объёме (англ. *thermal confinement*), тогда как для достижения того же режима при абляции роговицы предпочтительны более короткие импульсы. Учёт этого эффекта необходим, в частности, в медицине для того, чтобы разрезы, выполненные с помощью лазера, имели чёткие контуры [21,68]. Легко видеть, что эти же соображения относятся и к картированию органических образцов методами ЛИЭС или ЛА-ИСП-МС.

На кинетику и динамику процесса абляции также влияют механические свойства биологических тканей (растяжимость и прочность). Трудность оценки этого влияния состоит в том, что механические характеристики, как правило, определяют при очень малых скоростях возрастания нагрузки ($\sim 10^{-3} \text{ с}^{-1}$), в то время как при лазерной абляции

эта скорость по крайней мере 100 млн раз выше ($\sim 10^5 - 10^7 \text{ с}^{-1}$). По имеющимся данным, предел прочности на разрыв (в Па) при высоких скоростях приложения нагрузки выше, чем при низких, хотя разрывная деформация, возможно, остаётся такой же [21,70].

При облучении ткани лазером в ней развиваются термоупругие напряжения. Они выражены в наибольшей степени, когда длительность импульса меньше или имеет тот же порядок, что и время, необходимое звуковой волне для прохождения через нагретый слой, т.е. $t_{\text{имп}} \sim 1/\mu_a c_a$, где c_a — скорость звука в данной среде. Например, если коэффициент поглощения белка в ближней УФ-области составляет около 300 см^{-1} , а скорость звука — 1500 м/с , то соответствующее время составит 22 нс. При использовании Nd:АИГ-лазера, длительность импульса которого составляет менее 10 нс, можно считать возникающее напряжение локализованным в границах пятна фокусировки. Тогда пиковое напряжение будет равно $\sigma = \frac{\alpha \mu_a}{\rho c_v \kappa_T} \Phi_0$, где α — коэффициент теплового расширения, ρ — плотность материала, c_v — его изохорная теплоёмкость, κ_T — изотермическая сжимаемость, а Φ_0 — доза облучения (Дж/см^2). Несмотря на то, что менее 1 % энергии лазерного импульса превращается в энергию термоупругого напряжения [71], величина σ , в зависимости от дозы облучения, может измеряться тысячами атмосфер ($\sim 10^8 \text{ Па}$, что превышает прочность мягких тканей), причём, в соответствии с природой звука, напряжение возникает попеременно как на сжатие, так и на растяжение. Поэтому при лазерной абляции, помимо прохождения ударной волны, образующейся при формировании лазерной плазмы, этот фактор значительно влияет на механическое разрушение материала. Чем лучше локализация напряжения, тем меньше энергии нужно для эффективной абляции и тем меньше термическое повреждение окружающего материала [21,72].

Для тканей, содержащих большое количество воды, могут реализовываться разные механизмы выноса вещества с поверхности, включающие в себя фазовый взрыв (происходящий при распаде спинодаля) или кипение в ограниченном объёме (соответствующее перемещению вдоль бинадаля жидкость – пар на фазовой диаграмме). Здесь играют роль не только характеристики самой воды, но и прочих компонентов ткани, в частности, прочность на разрыв [21].

Известно, что с помощью УФ-лазера (эксимерного лазера на фториде аргона, $\lambda = 193 \text{ нм}$) можно проводить абляцию роговицы глаза с высокой пространственной точностью и без повреждения остального материала мишени. Объяснение таких хороших характеристик абляции можно искать прежде всего в энергии квантов УФ-

излучения, которой достаточно для разрыва большинства связей, присутствующих в органических соединениях, что приводит к снижению термических эффектов при действии УФ-излучения с очень короткой длиной волны (193, 157 нм; см. выше) [73]. Вклад фотохимических процессов быстро убывает с увеличением длины волны излучения и становится незначительным для $\lambda > 300$ нм [21,74]. Эксперименты на полиметилметакрилате (ПММА) показали, что при дозах облучения, не превышающих порог абляции, вся энергия импульса расходуется на нагревание поверхности [75]. После превышения порога абляции нагревание поверхности очень слабо зависит от количества поступающей энергии.

Облако продуктов абляции состоит из атомизованных продуктов разложения тканей, а также водяного пара и капель, газообразных органических продуктов и частиц ткани. При абляции мягких тканей со значительным содержанием воды наблюдается задержка между появлением ударной волны и выбросом частиц с поверхности, составляющая величину порядка 100–200 нс. Предполагают, что это время необходимо для перехода воды в сверхкритическое состояние и последующего расширения, в ходе которого ударная волна частично отражается от окружающего неподвижного газа, возвращается к поверхности мишени и вызывает выброс частиц [21]. Процесс выброса частиц может продолжаться в течение времени, на 3–5 порядков превышающего длительность лазерного импульса, в зависимости от механических свойств ткани, дозы излучения и диаметра луча [76].

Диагностика плазмы биологических образцов (оценки температуры и электронной плотности) имеет некоторые особенности. В принципе, для определения температуры можно использовать ионные линии углерода и кислорода [77–79], но такой подход возможен, только если плазма достаточно горячая и не очень плотная (например в атмосфере инертного газа при пониженном давлении). Помимо того, что такие условия значительно затрудняют проведение измерений, определение, например, щелочных металлов не будет иметь смысла из-за их полной ионизации. Железо, активно используемое для диагностики плазмы других матриц (например, почв или горных пород), в случае животных тканей использовать затруднительно из-за того, что его содержания малы (менее 0.1 %) для надёжной регистрации необходимого набора спектральных линий. Большая часть диапазона 370–380 нм, богатого переходами железа с различными энергиями верхнего уровня, занята интенсивной полосой радикала CN. Существуют методики [80], когда в образец добавляют такие металлы, как Fe или Pb; конечно, такой способ имеет очевидные недостатки. Поэтому приходится пользоваться спектральными

линиями неосновных компонентов — прежде всего, кальция как элемента с относительно богатым и ярким спектром.

Для оценки параметров плазмы, наиболее благоприятных для достижения максимальной интенсивности сигнала, мы рассмотрели (Рисунок 1.4) зависимости интенсивности аналитических линий атомов и ионов с различной энергией верхнего уровня от температуры плазмы для соотношения содержаний элементов, соответствующих ГСО Тр-1 (травосмесь, см. Таблицу 2.2). Интенсивности рассчитывали по уравнению (12) с учётом ионизации вплоть до двухзарядных ионов по уравнению Саха (2) при фиксированной электронной плотности, равной $5 \times 10^{16} \text{ см}^{-3}$ с использованием вероятностей пе-

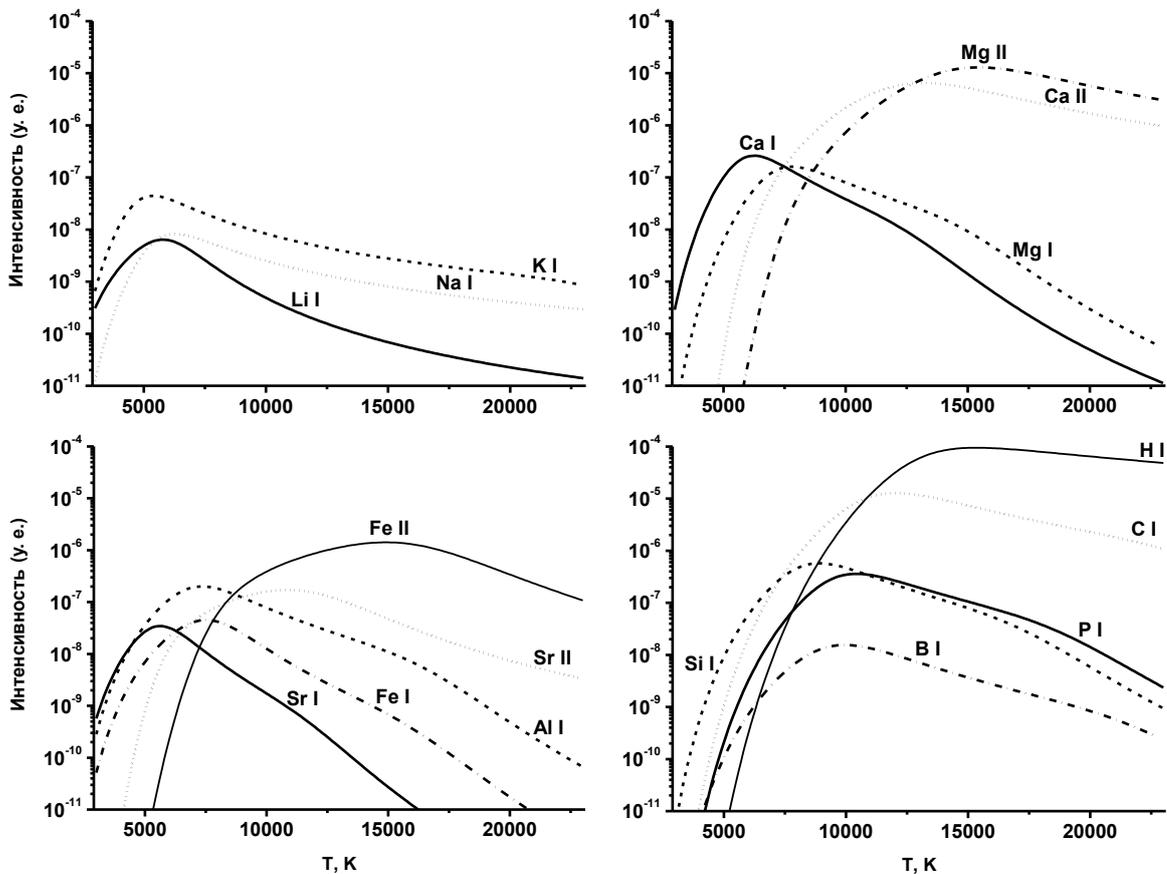


Рисунок 1.4. Интенсивность эмиссии для некоторых химических элементов биологической матрицы в зависимости от температуры плазмы (с учётом вероятностей переходов) для ГСО Тр-1. Показаны интенсивности следующих переходов (λ в нм): Li I 670.78, Na I 330.26, K I 404.41, Mg I 517.27, Mg II 279.80, Ca I 612.22, Ca II 315.887, Fe I 371.99, Fe II 259.94, Sr I 460.73, Sr II 407.77, Al I 396.15, Si I 252.41, B I 249.68, H I 656.28, C I 247.86 и P I 213.62 нм. $N_e = 5 \times 10^{16} \text{ см}^{-3}$.

реходов из базы [47]. Видно, что наблюдение линий максимально возможного числа элементов, составляющих биологический материал, может быть достигнуто только путём подбора неких компромиссных условий эксперимента. Например, интенсивность линий неметаллов достигает максимума при температуре около 10 000 К, когда атомные линии щелочных металлов становятся малоинтенсивными. Так, при 10 000 К

интенсивность линии Р I при 213.62 нм более чем на порядок превосходит интенсивность линии К I при 404.41 нм несмотря на то, что мольное содержание калия в образце превосходит содержание фосфора в 5 раз. Можно утверждать, что для получения наиболее информативного спектра температура плазмы должна быть не меньше 7000 К. Такие условия легко могут быть реализованы в ЛИЭС [34].

Для надёжного определения температуры целесообразно пользоваться графиками Саха—Больцмана (см. раздел 1.1.4), потому что последние позволяют учитывать одновременно и атомные, и ионные линии, тем самым значительно расширяя диапазон доступных энергий. Для оценки электронной плотности самым удобным и часто используемым вариантом является линия водорода Н-альфа. Параметр штарковского уширения этой линии на порядок превышает таковой для линий других элементов; энергетические характеристики этого перехода почти исключают самопоглощение, которое в других случаях приводит к переоценке ширины профиля и, соответственно, электронной плотности. Всё это благоприятно сказывается на погрешности оценки. С другой стороны, высокий потенциал возбуждения затрудняет наблюдение линии на средних и поздних временах существования плазмы. По той же причине возможна ситуация, когда излучение водорода поступает не из той же зоны плазмы, из которой излучают линии атомов с низкой энергией ионизации. Такое пространственное разделение приводит к различающимся оценкам электронной плотности в зависимости от выбора диагностической линии. В силу этих обстоятельств альтернативу линии Н-альфа могут представлять, например, некоторые сигналы Na I, если его содержание в образце достаточно высокое.

1.2. Применение лазерно-искровой эмиссионной спектрометрии в элементном анализе

1.2.1. Общие замечания

В основе количественного анализа методом ЛИЭС лежит линейная зависимость интенсивности от концентрации атомов в плазме (12). Основа (матрица) пробы, как правило, наиболее существенным образом влияет на амплитуду аналитического сигнала из-за её влияния на температуру, массу испаренного вещества и степень атомизации [36] (это и есть так называемый матричный эффект). Кроме того, вариации размера, формы и пространственного положения лазерного факела неизбежно влияют на количество излучения, попадающего на щель спектрографа и на детектор.

Пробоподготовка в ЛИЭС минимальна [39] и требует, в основном, очистки от поверхностных загрязнений. В связи с этим полезно (по возможности) подавать на

поверхность пробы несколько т.н. очищающих лазерных импульсов, прежде чем регистрировать аналитический сигнал. Если во время абляции образуется большое количество аэрозоля, рекомендуется снизить частоту лазерных импульсов до 1–2 Гц, чтобы избежать оптического пробоя на его частицах и, таким образом, улучшить стабильность сигнала [63].

При анализе порошкообразных проб ударная волна, возникающая при лазерном пробое, вызывает разлёт мелких частиц порошка. Поэтому пробы прессуют в таблетки, которые являются наиболее удобной и широко используемой формой образца в ЛИЭС для анализа порошков [81]. Для плохо прессующихся проб, например, силикатов, могут быть использованы связующие добавки [82,83], такие как микрокристаллическая целлюлоза или поливиниловый спирт. При этом нужно учитывать, что добавки — возможный источник загрязнения образца.

При оптимизации экспериментальных методик учитывают длительность импульса и длину волны испаряющего лазера, плотность мощности излучения, состав и давление окружающей атмосферы, а также временные параметры наблюдения и регистрации сигнала [63]. При использовании ультракоротких импульсов вместо наносекундных общий запас энергии в плазме меньше из-за отсутствия взаимодействия с ней лазерного излучения, поэтому интенсивность спектральных линий в этом случае снижается, а время жизни плазмы уменьшается [15,84].

На прецизионность [85] ЛИЭС влияют колебания массы и фракционного состава испаряемого материала, а также особенности разлёта плазмы от импульса к импульсу. О воспроизводимости испаряемой массы можно судить по воспроизводимости геометрии образующихся на поверхности мишени кратеров. Правильная и воспроизводимая форма кратеров, без наплывов и неровностей, характерна для фемтосекундной абляции, особенно в атмосфере инертного газа при пониженном давлении [17]. Другой путь — использование ультрафиолетового излучения. В работе [86] сравнили метрологические характеристики при использовании лазеров с длинами волн 1064 и 355 нм, и было показано, что лучшая прецизионность достигается во втором варианте. Физические причины этих явлений более подробно обсуждались в разделе 1.1.1.

Чтобы исключить оптический пробой в атмосфере над мишенью или на частицах аэрозоля, образующихся при испарении мишени, фокус лазерного пучка устанавливают на 2–5 мм ниже поверхности мишени. Если в одну и ту же точку подаётся несколько импульсов, такой приём предотвращает слишком быстрое изменение условий фокусировки пучка по мере углубления кратера [63].

Так как лазерный факел неоднороден в пространстве и быстро меняется во времени, для минимизации систематических погрешностей предпочтительна такая конфигурация системы сбора излучения, которая позволяет собирать излучение всего объёма плазмы на щель спектрографа [87]. Естественно, это не касается тех случаев, когда предполагаются измерения с пространственным разрешением. Для борьбы с флуктуациями сигнала от импульса к импульсу разработаны алгоритмы нормирования спектров и исключения промахов, использующие значения различных сигналов, например, спектр излучения континуума, интенсивных линий основы пробы и др. [88–90].

Как и в других атомно-эмиссионных методах, для улучшения точности количественного анализа в методе ЛИЭС используют нормализацию на сигнал внутреннего стандарта. Внутренним стандартом чаще всего служит эмиссионная линия какого-либо элемента, присутствующего в пробе, хотя возможна нормализация и на величины другого рода (акустический сигнал, интенсивность фона, общее излучение плазмы и др.) [88,91]. Записав соотношение интенсивностей линий определяемого элемента I_A и внутреннего стандарта I_C в соответствии с уравнением (12), получим:

$$\frac{I_A}{I_C} = \left(\frac{g_A A_A N_A \lambda_C Z_C}{g_C A_C N_C \lambda_A Z_A} \right) \exp \left(\frac{E_C - E_A}{kT} \right). \quad (21)$$

Если энергии возбуждения используемых линий близки, то устраняется влияние флуктуаций температуры, например, линии Ca II 396.847 нм и Sr II 407.771 нм (энергии верхних уровней составляют 3.12 и 3.04 эВ, соответственно, а отношение $Z(\text{Ca II})/Z(\text{Sr II})$ на отрезке от 3000 до 15 000 К изменяется в пределах от 1.00 до 1.05). Не всегда применение внутреннего стандарта, выбранного по указанным термодинамическим критериям, улучшает метрологические характеристики анализа, что можно объяснить, например, фракционным испарением или помехами при атомизации аблированного материала. Поэтому авторами работы [92] предложен т.н. корреляционный критерий, согласно которому сигнал внутреннего стандарта должен иметь высокий коэффициент корреляции с аналитической линией и сопоставимую с ней интенсивность, а содержание элемента, используемого в качестве внутреннего стандарта, не должно значительно колебаться от пробы к пробе. Достоинством этого критерия является его применимость независимо от наличия ЛТР в плазме.

Для увеличения чувствительности ЛИЭС за счёт увеличения массы испаряемого вещества, степени его атомизации, температуры и времени свечения плазмы используют дополнительное возбуждение (с помощью второго лазерного импульса [90,93–95], электрической искры [96,97], микроволнового поля [98] и т.п.). Кроме того, существует

такой приём, как ударное сжатие плазмы в микрокамере. Ударная волна, отражаясь от стенок камеры, сталкивается с фронтом плазмы, вызывая увеличение температуры, увеличение числа возбуждённых частиц и усиление эмиссионного сигнала в несколько раз [99]. Ещё одним вариантом усиления сигнала является анализ с предварительной модификацией поверхности наночастицами, прежде всего для случаев, когда нельзя задействовать мощные лазерные импульсы, а также при анализе по спектру плазмы от единичного импульса [100] — например, при анализе биологических образцов [101]. Существенным недостатком использования наночастиц часто является присутствие в их растворах остатков непрореагировавших реагентов, что может приводить к загрязнению образца. Также на примере магниевых сплавов было показано, что накопление сигнала от 3 импульсов с предварительным очищающим импульсом превосходит эффект от использования наночастиц для одиночных импульсов (рост отношения сигнал/шум в 2 раза) [102].

Влияние фонового излучения плазмы уменьшают, подбирая временные параметры регистрации сигнала при использовании стробируемых детекторов [36,63]. Также необходимо учитывать зависимость чувствительности регистрирующей системы от длины волны излучения [103].

При абляции некоторых проб в спектрах могут наблюдаться молекулярные полосы CN, C₂ [104], CaO, CaCl, BO, TiO, оксидов РЗЭ [104,105]. Как и в классическом спектральном анализе, ценность молекулярных сигналов состоит в том, что с их помощью можно определять элементы с большими энергиями возбуждения. Так, фтор и хлор, трудно поддающиеся прямому определению (ср. [106]), можно определить по молекулам CaF и CaCl [107]. Кроме того, значительные изотопные сдвиги порядка десятых долей нанометра, характерные для спектров молекул (в отличие от атомов), позволяют различать сигналы молекул ¹⁰BO и ¹¹BO, изотопологи SrO, SrF, SrCl, C₂ и CN [108–110].

Пределы обнаружения в ЛИЭС, естественно, значительно изменяются от элемента к элементу. В целом можно сказать, что для большинства элементов типичный предел обнаружения имеет порядок $n \times 1$ мкг/г [111]. Достоинствами ЛИЭС является возможность прямого анализа твёрдых и жидких образцов без предварительной пробоподготовки; количественное определение как лёгких, так и тяжёлых элементов; высокая скорость регистрации эмиссионного сигнала, обеспечивающая уникальную экспрессность этого метода (менее 0.01 с на одно аналитическое измерение) [112]; возможность проведения локального (латеральное разрешение до 0.5 мкм) и послойного (разрешение по глубине до 50 нм) анализа, что позволяет получать подробные карты распределения

интересующих элементов с разрешением до нескольких микрометров, в том числе в органах животных [64]; возможность дистанционного анализа в космических и морских экспедициях [1,113]. Относительная простота конструкции приборов ЛИЭС и совершенствование лазерной техники привело к созданию многочисленных портативных приборов, пригодных для работы в полевых условиях [33–35].

ЛИЭС также используется для анализа пресных и морских вод [114], природных и технологических рассолов. Большой интерес представляет изучение погружённых в воду объектов. Разработаны ЛИЭС-приборы для глубоководных исследований [1]. В этих условиях время жизни плазмы существенно меньше, чем на воздухе, а также наблюдается уширение линий из-за высокого давления. Отмечается, что использование лазерных импульсов большой длительности (150 нс, по сравнению с обычными импульсами короче 20 нс) позволяет в значительной степени нивелировать оба этих эффекта: увеличивается яркость плазмы и на некоторых этапах существования плазмы в образовавшемся пузырьке наблюдаются достаточно узкие линии. Использование двухимпульсного воздействия также позволяет значительно увеличить интенсивности сигнала: первый импульс создаёт пузырёк с газопаровой смесью внутри жидкости, а второй создаёт в пузырьке лазерную плазму, излучение которой используется для аналитических измерений [115].

1.2.2. Картирование эмиссионных сигналов

Будучи, прежде всего, методом локального анализа, ЛИЭС позволяет проводить анализ с пространственным разрешением, причём как по поверхности, так и по глубине образца [116–119]. В отличие от ЛА-ИСП-МС, картирование методом ЛИЭС исключает эффекты памяти и необходимость в периодическом продувании системы чистым газом, а также позволяет определять такие элементы, как Н, С, N и О, важные при работе с биологическими образцами [118].

Поскольку пространственное разрешение зависит от диаметра абляционного кратера, добиваются их минимального размера, что возможно при использовании пучков с $M^2 = 1$ (гауссова мода). Очень важной характеристикой лазера при картировании является частота повторения импульсов. Она напрямую определяет скорость получения карты. Например, если необходимо картировать 1 см^2 поверхности с разрешением 50 мкм (без перекрывания кратеров), то даже без накопления сигнала в одной и той же точке потребуется 40 000 лазерных импульсов. При частоте 10 Гц на такой анализ уйдёт более часа. Если разрешение улучшить до 10 мкм, то потребуется уже 27 ч. Поэтому предпочтительно использование твердотельных лазеров с диодной накачкой или

волоконных лазеров, которые могут работать на частотах в сотни герц [118]. Энергия единичного импульса у таких лазеров невелика (как правило, не более нескольких миллиджоулей, хотя есть исключения), чтобы избежать образования больших кратеров и потери разрешения. При этом слишком малая площадь пятна ведёт к уменьшению количества аблированного вещества и потере чувствительности.

При достаточной длине перетяжки (например, для линзы с фокусным расстоянием 120 мм, диаметра пучка 12 мм и $\lambda = 1064$ нм она составляет 4 мм) небольшие неровности поверхности не влияют существенным образом на условия абляции и правильность анализа. В этом случае также отпадает необходимость в автоматической фокусировке пучка в каждой точке, которая очень сильно замедляет сканирование поверхности.

Идеальным вариантом является создание вокруг плазмы атмосферы гелия или аргона для увеличения чувствительности [118,120]. При использовании фиксации образца в твёрдой полимерной матрице, например, в эпоксидной смоле, становится возможным приготовление тонких срезов материала и построение трёхмерных карт со значительным размахом по глубине образца [121].

Одним из самых известных примеров картирования методом ЛИЭС является трёхмерная визуализация распределения содержащих наночастиц на основе гадолиния

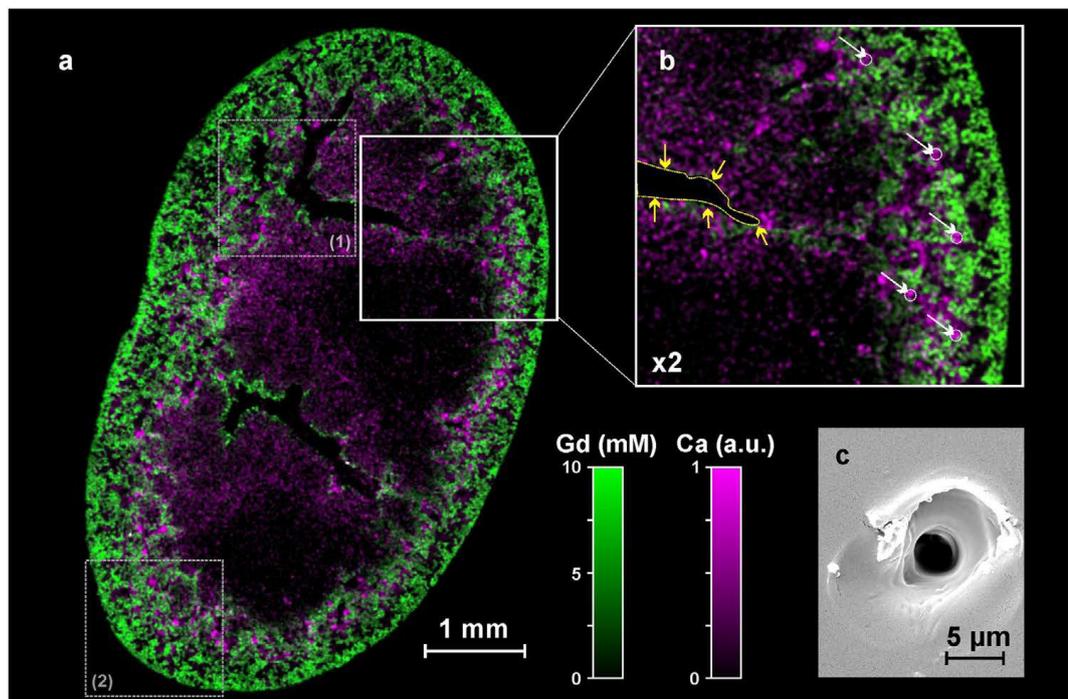


Рис. 1.5. Карта распределения Gd (зелёный цвет) и Ca (фиолетовый) на срезе мышинной почки, полученная методом ЛИЭС [121]: а) общий вид, б) двукратно увеличенный участок; жёлтые стрелки указывают на собирающий проток, белые — на почечные тельца; в) изображение единичного кратера, полученное методом сканирующей электронной микроскопии.

в мышинных почках, полученная путём сложения двухмерных карт тонких срезов образца, иммобилизованного в эпоксидной смоле [121]. Пример двухмерной карты из той же работы показан на Рисунке 1.5. Пространственное разрешение составило 10 мкм. Вопросы определения количественного состава в каждой точке карты обсуждаются в работе [122].

Существенными проблемами при аналитическом использовании ЛИЭС остаются существенные матричные эффекты, ухудшающие метрологические характеристики аналитических измерений, а также недостаточно хорошая воспроизводимость спектров. Поэтому при проведении анализа необходимо стремиться использовать стандартные образцы сравнения, близкие по составу к анализируемому образцу, либо использовать варианты определения состава только на основании спектральных данных. Возможно применение методов коррекции сигнала (например, с использованием внутреннего стандарта). По возможности рекомендуется накапливать большое число спектров для уменьшения погрешности сигнала. Поскольку атомно-эмиссионные спектры, как правило, богаты линиями, во многих случаях целесообразно использовать многомерные градуировки и иные хемометрические алгоритмы для достижения целей анализа.

1.2.3. Лазерно-искровая эмиссионная спектроскопия без образцов сравнения

Во всех инструментальных методах анализа существует функциональная зависимость концентрации от физического параметра (сигнала). Если существующее оборудование и надёжность теоретической функции позволяют в реальных условиях напрямую рассчитывать концентрацию в абсолютных единицах по результатам единственного измерения физического параметра, то можно говорить об *абсолютном методе анализа* (самый распространённый пример — кулонометрия [123]). В ряде случаев необходимость использования эталонов (стандартных образцов) возникает крайне редко — например, при калибровке нового детектора по спектральной чувствительности; в этом случае можно говорить о проведении анализа без образцов сравнения. Такие подходы известны в различных спектральных методах: ИК-спектрометрии [124], атомной абсорбции [125], рентгенофлуоресцентном анализе [126] и др. Низкая точность измерений, обусловленная отклонением наблюдаемой зависимости от теоретических модельных представлений, а также трудности воспроизведения результатов на разных приборах являются «ахиллесовой пятой» подобных подходов и вызывают скепсис относительно возможности их повсеместного использования [35]. При этом, как отмечается в техническом отчёте ИЮПАК, прогресс в этой области возможен и полезны любые

шаги, направленные на снижение зависимости от использования образцов сравнения для устранения матричных эффектов [127].

В эмиссионной спектроскопии очевидной проблемой при реализации методик количественного анализа без использования образцов сравнения является проблема перехода от измеряемых относительных интенсивностей к абсолютным интенсивностям спектральных линий в плазменном источнике, т.е. определение параметра Φ в формуле (12).

Нормировка суммы содержаний всех элементов на единицу, позволяющая избежать вычисления значения Φ , — была ключевой идеей, положенной в основу наиболее распространённого варианта ЛИЭС без образцов сравнения (ЛИЭС БОС, англ. Calibration-Free LIBS, CF-LIBS) [128] с целью обойти трудности, связанные с матричными эффектами и использованием твёрдых образцов сравнения. В этом варианте применяют формулу (13)

$$\ln \frac{I\lambda}{gA} = \ln \left(\frac{\Phi hcN}{4\pi Z} \right) - \frac{E}{kT}$$

к набору спектральных линий каждого из имеющихся в образце химических элементов (для простоты сначала предположим, что ионизацией можно пренебречь). Тогда для каждого элемента это уравнение будет задавать линейную функцию относительно $1/T$, а отсекаемый на оси ординат отрезок $\ln \left(\frac{\Phi hcN}{4\pi Z} \right)$ будет пропорционален мольной доле этого элемента. Принимая во внимание, что сумма мольных долей равна единице, можно исключить Φ из системы уравнений и вычислить элементный состав плазмы.

ЛИЭС БОС позволяет существенно расширить применение ЛИЭС для объектов, для которых стандартных образцов (СО) химического состава недостаточно или вовсе нет. К подобным объектам относятся и многие биологические объекты. Таким образом, ЛИЭС БОС на момент своего появления рассматривалась как хорошая альтернатива анализу с помощью традиционных градуировочных зависимостей.

Моделирование состава плазмы с учётом всех возможных физико-химических процессов давно применяется для подбора условий анализа в атомно-эмиссионной, атомно-абсорбционной и других видах спектроскопии с различными атомизаторами, а также в плазмохимии [129–131]. Но в ЛИЭС, где прямой контроль за условиями испарения пробы (главным образом, за температурой) затруднён, основное внимание уделяется моделированию с целью решения так называемой обратной задачи, которая заключается в оценке параметров плазмы и состава образца по его спектру. Пренебрегая

образованием многоатомных частиц, объёмную концентрацию элемента А можно определить как сумму концентраций его незаряженной и ионизированных форм в плазме [29]:

$$n_A = \sum_{z=0}^{z_{max}} n_A^z \quad (22)$$

Здесь n_A^z — концентрации атомов А с зарядом z , а z_{max} — максимальный заряд, для которого концентрации соответствующих частиц ещё не является пренебрежимо малой.

Решая систему уравнений (22), записанных для всех элементов с учётом уравнения Саха (2) при заданной электронной плотности, получим концентрации всех частиц в плазме. Плазма должна удовлетворять условию электронейтральности:

$$n_e = \sum_A \sum_{z=1}^{z_{max}} z n_A^z. \quad (23)$$

Для установления состава плазмы, состоящей из M элементов, необходимо провести измерение не менее $M + 1$ спектральных сигналов — по одной интенсивности эмиссионной линии для каждого из M элементов и одной дополнительной интенсивности для какой-либо частицы, чтобы можно было определить температуру по соотношению двух линий. Однако из-за многочисленных факторов (погрешности вероятностей переходов, спектральные помехи и пр.) используют несколько линий для каждой частицы, что также позволяет оценивать наличие ЛТР в плазме. При этом предполагается, что электронную плотность можно рассчитать по штарковскому уширению (или сдвигу) одной из уже используемых линий.

ЛИЭС БОС подразумевает следующие допущения: а) соответствие состава плазмы составу мишени, б) однородность плазмы, в) наличие локального термодинамического равновесия (ЛТР, см. раздел 1.1.2) и г) малая оптическая толщина плазмы (пренебрежимо малое самопоглощение) [132,133]. Таким образом, для расчёта состава необходимо предварительное определение температуры и электронной плотности лазерной плазмы (см. раздел 1.1). Стандартный алгоритм подразумевает построение для каждого элемента графика Больцмана (или Саха-Больцмана [49,50,134]), наклон которого зависит от температуры, а свободный член пропорционален концентрации элемента в плазме.

Также отмечают, что ЛИЭС БОС более точна для основных элементов пробы, чем для неосновных и следовых; правильность определения основных элементов

характеризуется погрешностями в единицы процентов, тогда как для следовых элементов они составляют десятки и сотни процентов (это подробно проиллюстрировано в работе [135]). Такое соотношение объясняется тем, что в силу того требования, что сумма массовых долей всех элементов образца должна быть равна единице, небольшие относительные погрешности определения макроэлементов ведут к возникновению очень больших (сотни процентов) для неосновных элементов и тем более для микрокомпонентов. Вместо прямого расчёта концентраций всех элементов, присутствующих в образце, можно ограничиться расчётом соотношений пары элементов X и Y по следующему уравнению:

$$f = \frac{M_X}{M_Y} = \frac{\mu_X}{\mu_Y} \frac{I_{\lambda(X)} Z_X (gA)_Y \exp\left(-\frac{E_Y}{kT}\right) \alpha_Y \lambda(X)}{I_{\lambda(Y)} Z_Y (gA)_X \exp\left(-\frac{E_X}{kT}\right) \alpha_X \lambda(Y)}, \quad (24)$$

где M — абсолютная масса соответствующего элемента или его массовая доля в мишени [136]. Этот подход был впервые продемонстрирован итальянскими исследователями на примере анализа александрита BeAl_2O_4 [137]. Содержания бериллия и примесных элементов (железа и хрома) определяли по вышеприведённой формуле в виде соотношений элемент/алюминий. Преимущество этого подхода по сравнению с суммированием массовых долей всех элементов (см. их же работу по анализу метеоритов [138]) заключается в ограничении распространения неопределённости, что важно при определении малых содержаний элементов.

Поскольку при лазерной абляции может наблюдаться селективное испарение легколетучих элементов (фракционирование), а выбор линий, *a priori* не подверженных самопоглощению в условиях лазерной плазмы, практически невозможен, были предложены многочисленные модификации алгоритма, учитывающие неоднородность плазмы, самопоглощение и фракционное испарение элементов [139–142]. Подробнее вопросы испарения вещества при лазерной абляции освещены в разделе 1.1.1.

Несмотря на то, что существуют экспериментальные и расчётные методы оценки оптической толщины плазмы (см., например, [52]), отсутствие самопоглощения для выбранных аналитических линий зачастую постулируют без строгой проверки, что может приводить к существенным погрешностям. В работе [30] описана модель плазмы в предположении ЛТР, учитывающая оптическую толщину источника и позволяющая оценивать самопоглощение линий, исходя из состава образца. Использование такой модели весьма удобно при планировании эксперимента.

Степень однородности плазмы зависит, помимо других факторов, от атмосферы, в которой происходит абляция. Известно, что атмосфера инертных газов, прежде всего

гелия и аргона, позволяет добиться более однородной плазмы за счёт уменьшения обмена энергией с окружающим газом [35,143,144]. Помимо большего самопоглощения в неоднородном источнике за счёт наличия относительно холодной периферийной зоны, в случае легкоионизируемых элементов может значительно изменяться концентрация нейтральных атомов этих элементов во внешнем слое. Поэтому представляется целесообразным разрабатывать подходы по минимизации этого эффекта на результаты анализа.

Ещё одним вариантом преодоления проблемы перехода от относительных интенсивностей к абсолютным является прямая аппроксимация экспериментальных спектров расчётными данными [145–149]. Такой вариант позволяет учитывать и поглощение излучения в плазме, позволяя задействовать все линии в спектре без их предварительной оценки. Аппроксимацию спектров проводят либо с помощью итерационного алгоритма, оптимизируя на последовательных шагах параметры источника (температуру и электронную плотность) и состав плазмы [145,147], либо проводя стохастическую оптимизацию всех параметров сразу [30,148,150]. С одной стороны, такой подход позволяет задействовать весь массив экспериментальных данных, а с другой – сталкивается с хорошо известным «проклятием размерности» при необходимости подбирать большое количество переменных. Помимо этого, значительный вклад в функцию потерь аппроксимации вносят особенности профиля каждой линии, для точного описания которых необходимо знание штарковских параметров, известных для очень небольшого количества линий, и очень хорошее описание аппаратной функции. Попытка преодолеть этот недостаток предпринята в работе [150], где все линии в экспериментальном спектре интегрировали и проводили оптимизацию для набора интегральных интенсивностей — по сути этот вариант занимает промежуточное положение между способом на основе метода графиков Больцмана и моделированием спектров. Один пик здесь может состоять из нескольких близко расположенных спектральных линий, т.е. необходим возможно тщательный выбор диапазонов, чтобы спектральные помехи были минимальны. Аппроксимация экспериментальных спектров карбонатной смеси в условиях марсианской атмосферы (с помощью двухзонной модели) позволила получить исходные концентрации элементов пробы с погрешностью в рамках 25 %. Расчёты по созданному авторами алгоритму занимают несколько часов на обычном компьютере.

Достоинствами подхода, основанного на аппроксимации исходного спектра (без интегрирования) [30,44] являются использование широкого спектрального диапазона, оценка самопоглощения и спектральных помех в автоматическом режиме. Однако, недостаток известных значений штарковских параметров, сложность подготовки всех

необходимых данных и их большая размерность пока не позволяют перейти к массовому использованию этого подхода в аналитической практике.

Кроме стационарных моделей плазмы, существуют и динамические модели, учитывающие расширение лазерной плазмы во времени. Одна из них [151] зиждется на следующих постулатах: ЛТР выполняется в каждый момент времени и в каждой точке пространства; при расширении плазмы сохраняется её сферическая симметрия; химический состав плазмы не изменяется во времени; соотношения концентраций частиц определяются только столкновениями. В работе [148] эта модель была проверена экспериментально и показала хорошее согласие с экспериментом. Недостатками этой модели является необходимость получения спектров плазмы с пространственным разрешением, а также применение преобразований Абеля или Радона в ходе расчётов, что превращает элементный анализ в долгий и трудоёмкий процесс.

В литературе отмечается, что точность ЛИЭС БОС сильно уступает варианту с использованием образцов сравнения. Поэтому существует тенденция вносить в ЛИЭС БОС элементы градуировки. Известны гибридные модификации, разработанные с целью упрощения измерений и повышения их точности [152], в которых, как правило, используется один стандартный образец для корректировки [153–156]. Внесение элементов градуировки позволяет избавиться от ошибок, связанных с погрешностями вероятностей переходов и неточно измеренными кривыми чувствительности регистрирующих систем.

Так как для ЛИЭС БОС требуется ЛТР и, соответственно, высокая электронная плотность, измерения приходится выполнять в присутствии довольно интенсивного излучения континуума, флуктуации которого затрудняют точное измерение слабых сигналов микроэлементов. Это особенно касается органических матриц, состоящих из атомов с далеко отстоящими друг от друга энергетическими уровнями и потому требующих особенно высокой электронной плотности для существования ЛТР. В качестве решения этой проблемы авторы работы [157] предложили регистрировать спектры органических образцов при двух временных задержках: короткой (350 нс) и длинной (4500 нс). Это позволяет в оптимальных условиях отдельно определять трудновозбуждаемые элементы основы и примесные металлы.

Для ЛИЭС БОС требуется регистрация широкого спектрального диапазона с хорошим разрешением. Лучше всего этим требованиям соответствуют спектрографы, оснащённые эшелетами (хотя их чувствительность ниже, чем у спектрографов Черни–Тёрнера). Необходима коррекция сигнала на кривую спектральной чувствительности

спектрометра. Для выполнения условий ЛТР необходимо, чтобы время жизни плазмы было много больше, чем время, необходимое для установления равновесия. Так как время жизни плазмы зависит от энергии лазерного импульса, то существует нижняя граница энергии, при которой в плазме ещё будет сохраняться ЛТР. С другой стороны, минимизация самопоглощения требует минимизации размера плазмы, т.е. уменьшения энергии лазерного импульса. Выполнение обоих требований удаётся совместить при использовании наносекундных УФ-импульсов с энергией в несколько миллиджоулей [29].

В ЛИЭС БОС необходима регистрация сигнала с временным разрешением, чтобы спектры соответствовали не усреднённым по времени, а «мгновенным» состояниям плазмы (насколько этого можно достичь с учётом чувствительности детектора при сохранении приемлемого соотношения сигнала и шума). Авторы работы [158] рекомендуют, чтобы строб составлял не более 10 % от задержки регистрации после лазерного импульса. Другие авторы [147] считают, что эта величина может составлять и 50 %. Давление атмосферы, в которой происходит абляция, тоже имеет точку оптимума. Слишком низкое давление приведёт к низкой плотности плазмы, малому количеству столкновений в единицу времени и, следовательно, к отсутствию равновесия. Слишком высокое давление вызовет ускоренную столкновительную дезактивацию возбуждённых частиц, а высокая плотность вещества будет способствовать самопоглощению спектральных сигналов. Поэтому ЛИЭС БОС рекомендуется выполнять при атмосферном давлении [29]. Как уже указывалось выше, во многих случаях атмосфера гелия позволяет получить более интенсивные сигналы, более однородную и долгоживущую плазму [35,143,144].

Выбирая аналитические линии для ЛИЭС БОС, руководствуются точностью, с которой известны соответствующие вероятности перехода (они приводятся в спектроскопических базах данных). Чтобы снизить вклад неопределённости кривой спектральной чувствительности оборудования, линии лучше выбирать в узком спектральном диапазоне и в такой области, в которой чувствительность изменяется медленно (хотя это не всегда возможно). Следует избегать использования очень ярких линий, так как у них может быть значительное самопоглощение [29].

В целом метрологические характеристики ЛИЭС БОС уступают ЛИЭС с традиционной градуировкой из-за отклонений реального источника от модельных представлений и низкой точностью известных вероятностей перехода для ряда элементов, например, кальция. Кроме того, при учёте самопоглощения считают, что излучение попадает на детектор после прохождения фиксированного оптического пути, не учитывая

геометрию сбора излучения [135]. С другой стороны, ЛИЭС БОС может быть с успехом применена, когда высокая точность результатов не требуется (полуколичественный анализ), а также когда нет возможности подобрать калибровочные образцы с нужным химическим составом матрицы.

1.3. Принципы спектроскопии комбинационного рассеяния света (СКР)

Комбинационное рассеяние света — рассеяние световых волн, при котором частоты падающих и переизлучённых (рассеянных) волн отличаются друг от друга на частоты собственных колебаний в веществе (переходы между энергетическими уровнями в атомах и молекулах, частоты оптических фононов в кристаллах и т. п.) [159]. Благодаря этому спектроскопия КР света является эффективным методом изучения состава и строения вещества. Эффект КР был открыт в 1928 г. Л.И. Мандельштамом и Г.С. Ландсбергом в СССР (для кристаллов) и независимо от них Ч.В. Раманом и К.С. Кришнаном в Индии (для жидкостей) [160].

Рассеяние света может быть упругим (с сохранением исходной длины волны) и неупругим (с её изменением). Сечение упругого рассеяния на несколько порядков выше, поэтому частота 99 % рассеянного излучения (по интенсивности) совпадает с частотой возбуждающего излучения: это рассеяние Ми, когда размер рассеивающих частиц сравним с длиной волны падающего излучения, и рэлеевское рассеяние, когда частицы много меньше длины волны. Сдвиги КР по частоте не зависят от частоты возбуждающего излучения и представляют собой величины, равные собственным колебательно-вращательным частотам молекул. Как и в других видах молекулярной спектроскопии, в СКР света наблюдаются стоксова и антистоксова компоненты. Антистоксовы линии возникают, когда молекула перед поглощением фотона уже находится в возбуждённом колебательно-вращательном состоянии. Так как при комнатной температуре молекулы находятся преимущественно в основном колебательном состоянии, сигналы КР света в антистоксовой области значительно менее интенсивны, чем в стоксовой [161].

В терминах квантовой механики КР можно описать следующим образом [162]. В рамках приближения Борна—Оппенгеймера мы будем рассматривать только колебательное движение. У двухатомной молекулы имеется лишь одна колебательная степень свободы, т.к. имеется только одно межъядерное расстояние, которое может изменяться при колебаниях. Для N -атомной молекулы колебательных координат будет $3N - 6$ (для линейной $3N - 5$) — это т.н. *нормальные координаты*. Тогда колебательную энергию

молекулы E_v можно представить в виде суммы колебательных энергий по каждой координате. В гармоническом приближении это можно записать следующим образом:

$$E_v(v_1, v_2, \dots, v_n) = \sum_{k=1}^n h\nu_{ek} \left(v_k + \frac{d_k}{2} \right). \quad (25)$$

Здесь v_1, v_2, \dots, v_n — колебательные квантовые числа, h — постоянная Планка, ν_{ek} — колебательные постоянные, а d_k — степени вырождения колебательного состояния (могут быть равны 1, 2 или 3). Если для какого-либо уровня энергии одно из v_k равно 1, а остальные равны нулю, такой уровень называется *фундаментальным*. Если какое-то одно число v_k больше 1, а остальные равны нулю, соответствующий уровень носит название *обертонного*. Наконец, когда два или более квантовых чисел, характеризующих уровень, отличны от 0, уровень называют *составным* или *комбинированным*. Переходы между уровнями приводят к появлению колебательного спектра.

Не все переходы между уровнями возможны, т.к. существуют правила отбора. Интенсивность конкретного перехода пропорциональна квадрату момента перехода M_v , зависящего от оператора наведённого дипольного момента A : $M_v = AE$, где E — напряжённость поля возбуждающего электромагнитного излучения. Согласно правилам отбора в КР света разрешены переходы, когда хотя бы один из элементов оператора A отличен от нуля, что верно для поляризуемых молекул при наличии зависимости наведённого дипольного момента от нормальной координаты [162]. Другими словами, в комбинационном рассеянии активны колебания и вращения молекул, при которых с вращательным или колебательным движением изменяется *поляризация* молекул [161].

Интенсивность спектров КР света, как уже отмечалось, весьма невысока, так как вероятность КР много меньше вероятности упругого рассеяния. Для их изучения требуются высокоинтенсивные источники света и аппаратура с большой светосилой. В настоящее время в качестве источника излучения используют исключительно лазеры, которые благодаря монохроматичности и высокой мощности идеально подходят для СКР света. Желательно, чтобы длина волны источника далеко отстояла от области поглощения образца, иначе спектр КР будет перекрыт сильной флуоресценцией. Наилучшая чувствительность, как правило, достигается для наблюдения КР света в диапазоне 400–600 нм [41,44]. Использование лазеров с генерацией в ближней ИК-области исключает проблему, связанную с флуоресценцией исследуемого образца, но вынуждает принимать меры предосторожности, чтобы не допустить термического разложения пробы. Кроме того, увеличение длины волны возбуждения также заставляет увеличивать диапазон регистрируемых длин волн, а чувствительность существующих детекторов значительно

ниже в ИК-области. С учётом того, что диапазон обычно наблюдаемых комбинационных сдвигов составляет 4000 см^{-1} , нетрудно видеть, что на шкале длин волн ширина этого диапазона (в стоксовой области) составит $\frac{4000\lambda^2}{10^7 - 4000\lambda}$. Для $\lambda = 1064 \text{ нм}$ она будет равна, таким образом, 788 нм (т.е. вплоть до 1.852 мкм). Для 2-й гармоники Nd:АИГ-лазера ($\lambda = 532 \text{ нм}$) ширина того же диапазона сдвигов составляет всего 144 нм .

Рассеянное излучение обычно наблюдают под прямым углом к падающему пучку. Для отделения паразитного излучения также используют узкополосные отрезные или режекторные фильтры, двойные и тройные монохроматоры. В качестве детекторов для регистрации спектров КР света используются многоканальные детекторы (ПЗС, КМОП), в том числе с усилителем яркости [161,162].

Флуоресценция изучаемого образца почти всегда наблюдается как побочное явление в спектрах КР света при работе с твёрдыми многокомпонентными пробами, кроме исследований в антистоксовой области, имеющих ограниченное применение. Она ухудшает соотношение сигнала к фону или вовсе вызывает насыщение детектора. Существует много способов борьбы с нежелательной флуоресценцией, которые можно разделить на несколько групп. Первая — временная селекция, основанная на том, что рассеяние наблюдается только во время действия лазерного импульса (до 10 нс), а флуоресценция длится десятки или даже сотни наносекунд, чем рассеяние (пикосекунды). Очевидно, что такой подход возможен только при использовании дорогостоящих сверхбыстрых стробируемых камер с усилителем яркости и импульсных лазеров, что также усложняет и увеличивает габариты используемой аппаратуры [163,164].

Другая группа подходов основана на аппаратном или математическом вычитании сигнала флуоресценции. Так, разностная спектроскопия КР со сдвигом возбуждающей линии (SERDS) [165] основана на том, что спектр флуоресценции не меняется от небольшого изменения длины волны возбуждения, в отличие от спектра КР. Для этого могут применены комбинированные источники, состоящие из двух диодных лазеров, излучающих на немного отличающихся длинах волн, например, 671.0 и 671.6 нм , что позволяет после вычитания спектров друг из друга избавиться от фонового сигнала флуоресценции [166]. Однако этот вариант СКР света не устраняет возможное насыщение детектора сигналом флуоресценции; кроме того, возникают трудности, связанные с тем, что интенсивность флуоресцентного фона может изменяться из-за фотодеградации образца и других факторов [167]. Для устранения фонового сигнала также широко применяются математические алгоритмы, основанные на том, что флуоресцентный фон, имеющий широкополосную структуру, представляет собой медленно изменяющуюся

функцию по сравнению с узкополосным спектром КР света. Соответственно, возможно его описание многочленами и другими функциями [168,169], вэйвлет-анализ [170], дифференцирование [171], разложение методом главных компонент [164,172].

Существуют варианты СКР, направленные на усиление самого сигнала КР, например, спектроскопия гигантского КР (SERS) [173] или спектроскопия когерентного антистоксова рассеяния света (КАРС) [174]. Применительно к биологическим объектам СКР света используют для изучения строения белков [175], сахаридов [176], липидов [177] и прочих природных соединений [178], для картирования тканей [174]. Благодаря тому, что многие пластмассы имеют малоинтенсивный спектр КР, оказывается возможным анализировать продукты и лекарственные средства прямо сквозь упаковку [161].

1.4. Сочетание ЛИЭС и СКР

Комбинирование ЛИЭС со спектроскопией комбинационного рассеяния (СКР) света весьма плодотворно, поскольку эти методы органично дополняют друг друга (элементный и молекулярный анализ), а также могут быть реализованы в единой измерительной системе. Одной из самых распространённых аналитических задач для ЛИЭС, совмещённой с СКР, является изучение состава предметов искусства, археологических находок и вообще объектов культурного наследия (ОКН) [179], где на первый план выходят методы неразрушающего (малодеструктивного) анализа.

Самый простой способ сочетания ЛИЭС и СКР света — получение данных для одного объекта с использованием отдельного устройства для каждого из методов. С использованием такого подхода был показан синергический эффект от сочетания двух методов при изучении археологических артефактов [180–183], ОКН [184–190] и геологических объектов [191,192]. Для наиболее полного извлечения информации спектры КР и ЛИЭС могут быть объединены в один массив данных для анализа алгоритмами хемометрики (например, [193,194]). В работе [195] данные ЛИЭС и СКР света использовали для классификации чернил и пигментов с применением методов многомерной обработки данных. Применение метода главных компонент, формального независимого моделирования аналогий классов (SIMCA), дискриминантного анализа методом проекции на скрытые структуры (PLS-DA) и метода опорных векторов (SVM) позволило продемонстрировать преимущества объединения данных эмиссионной и колебательной спектроскопии для идентификации и классификации материалов.

Для регистрации спектров КР света и лазерной плазмы могут использоваться гибридные спектрометры; в частности, это было показано в цикле интересных статей, выпущенных коллективом из Германии [195–197]. Основная идея этих авторов —

использование двойного спектрографа с эшелетом для сочетания ЛИЭС и СКР света ([196], рисунок 1.6) с независимым оптическим трактом для каждого метода, однако для регистрации спектров используется один и тот же ПЗС-детектор. Для ЛИЭС разрешение составляло ~ 15000 в диапазоне 290–945 нм (щель 50 мкм), для СКР света — около 10000 для диапазона регистрируемых сдвигов 4500 см^{-1} (щель 120 мкм). Большим преимуществом такой системы является отсутствие подвижных элементов. Установка работает в режимах СКР света (He–Ne лазер) и ЛИЭС (Nd:АИГ лазер) попеременно. Установка приспособлена для автоматизированного картирования поверхностей с пространственным разрешением 50 мкм. Авторы также показали возможность послойного анализа ОКН обоими методами.

Аппаратное сочетание ЛИЭС и СКР света позволяет проводить локальный анализ сразу двумя дополняющими друг друга методами, что даёт большие преимущества

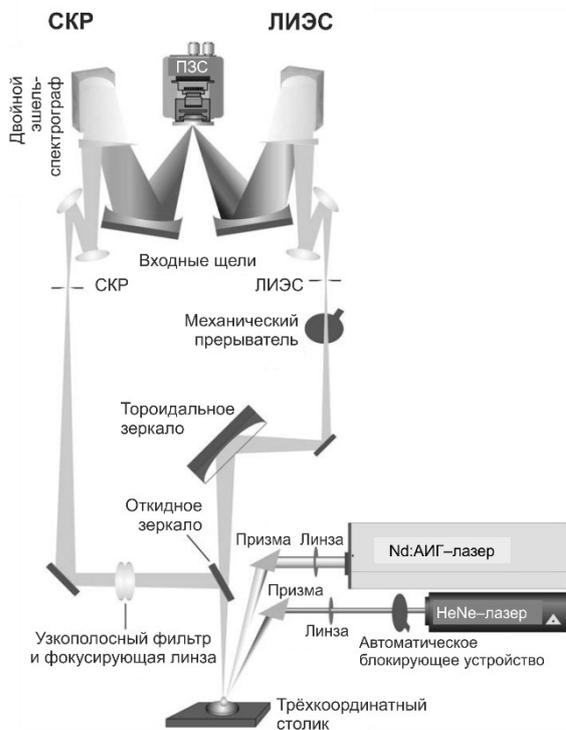


Рисунок 1.6. Схема комбинированной установки для ЛИЭС и СКР [196].

по сравнению с раздельным анализом. Одной из особенностей подобных систем является необходимость обеспечить плотность мощности лазерного излучения, различающуюся на три порядка: для ЛИЭС порядка ГВт/см^2 , а для КР — МВт/см^2 .

В простейшем варианте образец сначала освещают излучением небольшой мощности и регистрируют спектр КР света, а затем увеличивают мощность для создания лазерно-индуцированной плазмы и регистрации её излучения. Изменение мощности может производиться разными способами: изменением мощности накачки лазера, с помощью светофильтров или путём регулировки размера лазерного пятна на поверхности образца (т.е. остроты фокусировки) [63]. Во

многих работах используют два разных лазера, которые включают попеременно. Это позволяет более свободно выбирать длины волн возбуждающего излучения, подходящие для конкретной задачи. Именно такая схема использовалась в первой работе по сочетанию ЛИЭС и СКР, опубликованной группой исследователей из США (Ун-т Юж. Каролины, Нац. лаборатория в г. Лос-Аламос) с участием пионера ЛИЭС Давида Кремерса [198]. Изучали образцы гранита и почв. Для ЛИЭС использовали Nd:АИГ-лазер

($\lambda = 1064$ нм), а для СКР света использовали непрерывный аргоновый лазер ($\lambda = 514.5$ нм). Сигналы на выходе из спектрографа Черни–Тёрнера регистрировали одной и той же камерой с ПЗС-детектором с усилителем яркости. Измерения двумя методами выполняли попеременно. В работе отмечается недостаток кварцевого оптоволоконна, связанный с загрязнением спектра сигналами КР кварца в диапазоне $200\text{—}700$ см⁻¹. Для его отсеечения использовали два фильтра, один из которых был установлен на торце оптоволоконна, доставлявшего лазерное излучение к образцу, а другой — на торце оптоволоконна, собиравшего излучение плазмы.

Там же был впоследствии выполнен цикл работ по созданию комбинированных установок для космических исследований [199]. На рис. 1.7 приведена схема одного из

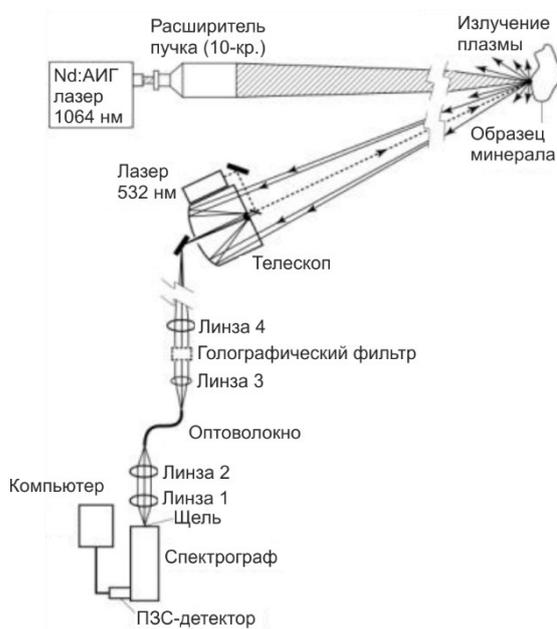


Рисунок 1.7. Схема комбинированной установки для ЛИЭС и СКР [200].

первых прототипов, разработанного этим коллективом [200]. В этой установке для создания плазмы применяли фундаментальную гармонику Nd:АИГ-лазера (200 мДж/импульс), а для СКР света используется 2-я гармоника ($\lambda = 532$ нм, 28 мДж/импульс). Эта длина волны часто используется для СКР света в комбинированных установках как наиболее подходящая из всех гармоник.

Поскольку в случае космических аппаратов необходимо работать на относительно больших расстояниях от прибора (в данном случае расстояние между анализиру-

емым объектом и прибором составляло 10 м), в дальнейшем было предложено использовать коаксиальную схему, когда излучение собирают с помощью телескопа, оптическая ось которого совпадает с лазерным лучом, или, по крайней мере, находится к нему как можно ближе. В 2012 г. исследователями из Гонолулу была запатентована конструкция такого комбинированного спектрометра [201,202], позволяющего получать «смешанные» спектры ЛИЭС и КР от одного и того же лазерного импульса. Лазер с длиной волны 532 нм наводят на мишень, находящуюся в 9 м от установки. Излучение образующейся плазмы и КР света собирают телескопом, пропускают через узкополосный фильтр и регистрируют на ПЗС с усилителем яркости. Для получения «чистого» спектра КР света плотность мощности уменьшают, понижая мощность испаряющего лазера и увеличивая диаметр пятна фокусировки. Авторы продемонстрировали получение

эмиссионных и КР-спектров различных минералов (карбонатов, сульфатов, силикатов и оксидов железа) в воздушной атмосфере.

В работе [203] обсуждается модификация конструкции ЛИЭС-спектрометра ChemCam, запущенного в 2012 г. на Марс в рамках программы Curiosity, с целью создания комбинированного спектрометра для ЛИЭС и СКР света для следующей миссии на Марс. Было предложено оснастить лазер кристаллом-удвоителем, так чтобы КР света возбуждалось излучением с длиной волны 533.5 нм. Так как сигнал КР значительно менее интенсивен, чем эмиссионный, предложено использовать спектрограф со светосилой $f/2$, содержащий две объёмно-фазовые голографические решётки для диапазонов 500–745 нм и 745–900 нм. Для реализации временной селекции сигналов и расширения диапазона измеряемых интенсивностей перешли к использованию стробируемого ПЗС-детектора с усилителем яркости.

После необходимых доработок подобный прибор был установлен на марсоходе Perseverance, достигшем поверхности Марса в 2021 г. В этом приборе, вошедшем в состав агрегата SuperCam, для ЛИЭС и СКР света используются две гармоники Nd:АИГ-лазера, как и в прототипе на рис. 1.7. Прибор работает либо в режиме ЛИЭС, либо в режиме СКР. Диаметр лазерного пучка регулируется телескопом, который одновременно собирает излучение. Расстояние до образца составляет до 15 м. Через оптоволокно излучение подаётся на три спектрометра, два из которых оснащены ПЗС-детекторами и предназначены для регистрации спектров в диапазонах 245–340 и 385–465 нм. Третий спектрометр оснащён ПЗС-детектором с усилителем яркости и в первую очередь предназначен для регистрации спектров КР света в диапазоне 535–853 нм, хотя может использоваться и для ЛИЭС с временным разрешением, а также для ЛИФ [204]. По состоянию на 2024 г. с помощью SuperCam проанализировано около 1000 геологических объектов на Марсе; 203 тыс. лазерных импульсов использовали в режиме ЛИЭС, 148 тыс. — в режиме СКР. В частности, в 2022 г. на поверхности Марса был обнаружен перхлорат натрия [205].

Сочетание ЛИЭС и СКР света также планировали реализовать в приборе, предназначенном для программы ExoMars [206,207]. Прототип прибора отличался компактностью и весил менее 1.5 кг. Для ЛИЭС использовали Nd:АИГ-лазер на микрочипе ($\lambda = 1064$ нм), для СКР света — непрерывный лазер с длиной волны 660 нм. Спектрометр на основе призмы, дифракционной решётки и ПЗС-детектора охватывал весь спектральный диапазон от 240 до 840 нм. Однако на настоящий момент этот проект не доведён до завершения. В статье [208] обсуждается конструкция чувствительного прибора для ЛИЭС, СКР и ЛИФ на основе ПЗС-детектора с усилителем яркости, подходящего для

исследований Марса. Работа [209] посвящена методикам анализа данных, которые могут быть получены двумя методами в ходе космических исследований. В частности, автор подчёркивает важность применения алгоритмов математической обработки многомерных данных для определения галогенов по эмиссионным полосам соответствующих молекул.

В работе [210] проводили анализ фрагмента римской фрески I в. Измерения проводили поочередно, ослабляя излучение 2-й гармоники Nd:АИГ лазера для регистрации СКР спектров (излучение лазера отсекали отрезным фильтром). Авторам удалось надёжно идентифицировать три из четырёх присутствовавших пигментов. Подобная система использовалась и в работе [211], посвящённой исследованию неорганических пигментов. В обеих работах проведено сравнение результатов СКР света в гибридной установке с данными, полученными на приборе с непрерывным лазером. Следует отметить работы [212,213], в которой, помимо СКР света и ЛИЭС, в той же самой установке был реализован и метод лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ). В качестве источника излучения использовали 2-ю (СКР света и ЛИЭС) и 4-ю гармонику (флуоресценция) Nd:АИГ-лазера для изучения природных и искусственных пигментов и связующих (яичного белка и кроликового клея), а также для анализа фрагментов фресок, глазури и бронзы IX–XVIII вв. В работе [214] исследовали пять образцов ультрамаринного синего методами ЛИЭС и СКР света. Было установлено, что для пигмента природного происхождения характерно присутствие кальцита, в отличие от искусственных аналогов. В следующей работе [215] гибридную систему для СКР света и ЛИЭС использовали для анализа (в том числе по глубине) образца с органической матрицей — специально приготовленного многослойного образца на основе кроликового клея с неорганическими пигментами, имитировавшего настенную роспись. Однако в спектрах КР авторы наблюдали только сигналы неорганических компонентов.

При использовании твердотельных лазеров с диодной накачкой (ЛДН) можно проводить измерения последовательно, регистрируя КР света в квазинепрерывном режиме при высокой частоте следования импульсов (десятки и сотни кГц) и малой энергии единичного импульса, а эмиссионные спектры при более низких частотах и, соответственно, при максимально достижимой энергии импульса [197,216]. В обоих приведённых работах для регистрации эмиссионных спектров и спектров КР света используют два разных спектрометра.

Альтернативный путь использованию двух лазеров или разных режимов работы одного источника — регистрация сигналов КР света и ЛИЭС различными спектрометрами с индивидуальными временными параметрами, как в работе [217], посвящённой

дистанционному получению спектров взрывчатых веществ. Однако даже в случае оптимизации энергии испаряющего импульса наблюдаются значительные спектральные помехи от непрерывного фона плазмы на сигнал КР света, поэтому время строба при регистрации КР должно быть достаточно коротким (в работе [217] оно было равно ширине лазерного импульса). Эту проблему удалось решить в работе [218], в которой регистрировали эмиссионные и КР-спектры с использованием одного лазера ($\lambda = 532$ нм), работающего в двухимпульсном режиме (2 импульса с задержкой 60 мкс во время одной вспышки лампы). При этом авторам удалось добиться 500-кратного различия энергии чередующихся импульсов (первый – 60 мкДж, второй – 25 мДж). При регистрации осуществляется временная селекция за счёт регистрации сигналов двумя спектрометрами, оснащёнными ПЗС с усилителем яркости. Эта установка позволяет получить спектры органических и неорганических веществ с хорошим отношением сигнала к шуму, а также проводить количественный анализ с построением градуировочных зависимостей. Двухимпульсная схема описана также в работе [219], однако здесь энергия импульсов различается всего в 4 раза.

При идентификации взрывчатых веществ целесообразно развитие дистанционных методик. В работах [217,220] продемонстрирована идентификация взрывчатых веществ на расстоянии 20 м с использованием установки, в которой испускание и рассеяние возбуждаются одним и тем же лазерным импульсом ($\lambda = 532$ нм, длительность импульса 5.5 нс), а разделение сигналов достигается с помощью временной селекции: КР регистрируют с задержкой 0.1 нс после лазерного импульса и стробом 5.5 нс, а спектр испускания — с задержкой 0.8 мкс и стробом 5 мкс. Также для данной системы был предложен оригинальный подход к объединению данных, основанный на построении матрицы (изображения) для образца на основании спектров КР света и лазерной плазмы, которое затем сопоставляется с эталонными данными [221]. Воздействие лазерного излучения не вызывает детонации вещества. В публикации [222] проведено сравнение различных методов сочетания данных ЛИЭС и СКР света. Авторы пришли к выводу, что перспективно использование двумерных сигнатур, полученных из спектров двух видов (например, внешнего произведения эмиссионного спектра и спектра КР).

Наконец, возможно также и пространственное разделение сигналов СКР и ЛИЭС. Для этого на поверхности образца формируют относительно большое пятно с выраженным градиентом плотности мощности падающего излучения. Из области с низкой освещённостью регистрируют сигнал КР, а из области с высокой освещённостью, где происходит лазерный пробой, — эмиссионный спектр. Этот способ сочетания описан в работе [223]. Образец освещали одновременно первой и второй гармониками Nd:АИГ лазера. Соотношение их мощностей (порядка 4:1) регулировали, подбирая параметры

модуляции добротности резонатора. После фокусировки на поверхности образца получались концентрические пятна диаметром 600 и 900 мкм для $\lambda = 1064$ и 532 нм соответственно. Таким образом, плотность мощности излучения в малом пятне почти на порядок превышало таковую в большом пятне. Лазерный пробой во внутреннем пятне давал эмиссионный спектр, а внешнее пятно служило источником КР. Всё излучение собирали телескопом и получали смешанные спектры, позволявшие различать кальцит, серу, сульфатные и сульфидные минералы в земной атмосфере и в среде, имитирующей атмосферу Марса (для подобных исследований имеются специальные устройства) [224]. Похожий принцип регистрации спектров использовали и испанские исследователи [225], создавая градиент плотности мощности в пятне эллипсовидной формы. Это удобно делать с помощью оптоволокну. Такой способ вызывает смешение сигналов, так что получается объединённый спектр, где эмиссионные линии накладываются на спектр рассеяния. Корейские исследователи [226] предложили изящную схему одновременной регистрации эмиссионных и колебательных спектров: на поверхности образца искусственно создаются две зоны разной освещённости с помощью расширителя пучка и маленькой собирающей линзы. В зоне высокой освещённости возникает плазма. Излучение собирают с помощью оптоволокну, конец которого передвигают, чтобы собирать желаемый вид сигнала (только эмиссия, только рассеяние или то и другое вместе).

Методы ЛИЭС и КР предъявляют примерно одинаковые требования к спектральному разрешению, однако, как правило, для ЛИЭС необходим более широкий спектральный диапазон и лучшее разрешение, чем для СКР света. Это привело к использованию во многих работах сразу нескольких спектрографов для регистрации эмиссии, охватывающих, например, УФ-, видимую коротковолновую и видимую длинноволновую области [223,227,228].

Авторы работы [229] подчёркивают следующее преимущество сочетания методов СКР и ЛИЭС: в то время как недорогие системы ЛИЭС позволяют определять катионный состав минерала, определение неметаллов, образующих анионы (С, N, O, S, Cl и др.), особенно при их определении на воздухе затруднено. СКР света даёт возможность определить анионный состав по их специфическим полосам. В сочетании с высоким пространственным разрешением лазерного зонда становится возможным определение не только химического, но и минералогического и фазового состава образца, т.е. комплексное изучение горных пород. Кроме того, нужно отметить возможность

предварительной очистки поверхности лазерными импульсами от пыли и продуктов выветривания, а также возможность получения профилей сигнала по глубине образца.

Р. Глаус [230] сообщает о применении комбинированной установки для изучения промышленных материалов и археологических находок (в последовательном режиме). В работе исследователей из Ирана [231] описаны два варианта установки для записи «смешанных» спектров минералов (с одним и с двумя лазерами). Сочетание аппаратного сочетания ЛИЭС и СКР для сортировки пластика рассмотрено в работе [232].

Настоящий обзор показывает, что ЛИЭС и СКР в настоящее время находят совместное применение главным образом при анализе горных пород (в обычном или дистанционном варианте), объектов культурного наследия и взрывчатых материалов. Интересно, что анализу образцов биологического происхождения и вообще органических веществ (за исключением взрывчатых) уделяется относительно немного внимания. Есть работа [233], посвящённая изучению личинок ручейников и почв методами ЛИЭС и СКР. В работе [234] проведено исследование пространственного распределения элементов и молекулярных компонентов в морской раковине с помощью комбинированной установки для ЛИЭС и СКР света. Авторы отметили, что данные ЛИЭС лучше коррелируют с ростом раковины, чем данные КР. Исследования бактерий описаны в обзоре [235]. Вопросы сочетания ЛИЭС и СКР рассмотрены в недавно вышедшей книге [236]. Таким образом, у этой комбинации есть ещё большой нераскрытый потенциал. В области математической обработки таких данных, помимо непосредственно задач дискриминации, качественного и количественного анализа, необходимо изучать приёмы, посвящённые методам совместного анализа разнородных данных, или носящие ещё более общий исследовательский характер — методы слепого разделения сигналов, которые будут кратко описаны в следующем разделе.

1.5. Хемометрические методы исследования экспериментальных данных

Повсеместное внедрение электронных многоканальных регистрирующих систем повлекло за собой необходимость анализировать большие массивы данных, выделяя из них значимую информацию [237], что применительно к данным химического анализа привело к появлению и развитию *хемометрики*. Основой для новой дисциплины послужили методы прикладной статистики, линейной алгебры, оптимизации и планирования эксперимента. Первым хемометрическим методом можно считать т.н. метод главных компонент (МГК), разработанный К. Пирсоном ещё в 1901 г. [238].

Как правило, перед применением любых методов анализа многомерных данных необходимо проводить их предварительную подготовку, чтобы уменьшить «шум

данных» и снизить вероятность выявления ложных зависимостей [4,239] из-за влияния нежелательных вариаций. Как правило, эти операции включают центрирование (вычет базовой линии-фона), удаление мешающих сигналов и фильтрацию шумов, а также нормирование (шкалирование). Нормирование нужно для того, чтобы уравнивать вклад в модель от предикторов с сильно различающимися диапазонами значений, или для совместной обработки блоков данных разной природы. Сочетание центрирования и нормирования называется автошкалированием. Стоит отметить, что предобработка данных имеет решающее значение для построения надёжной модели, позволяющей успешно проводить анализ. Однако выбор оптимальной схемы предобработки неочевиден, и применение тех или иных алгоритмов без тщательной валидации может приводить к ухудшению результатов [239].

Хемометрические методы можно разделить на две группы, соответствующие основным задачам: *исследование* данных и *предсказание* новых значений (в частности, построение регрессионных моделей) [237]. Как правило, любое исследование данных начинают с применения МГК. Математическая суть МГК состоит в следующем. Пусть имеется двумерная матрица \mathbf{X} , полученная в результате экспериментов с i образцами. Каждому образцу соответствует строка с j столбцами, каждый из которых соответствует какому-либо *предиктору*, например, длине волны, времени удерживания и т.п. Исходя из предположения, что многие предикторы могут быть скоррелированы, МГК можно представить как их преобразование в пространство, где координатные векторы (главные компоненты, ГК) выбираются ортогональными, т.е. между ними корреляции отсутствуют. Математически это означает представление \mathbf{X} в виде произведения двух матриц \mathbf{T} и \mathbf{P} таких, что

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^t + \mathbf{E}. \quad (26)$$

Здесь \mathbf{T} (размерностью $i \times a$) — матрица *счетов*, \mathbf{P} ($j \times a$) — матрица *нагрузок*, \mathbf{E} ($i \times j$) — матрица остатков. Буквой a обозначен т.н. эффективный (химический) ранг матрицы \mathbf{X} , который не превышает числа образцов и называется числом главных компонент (ГК). Количество ГК в идеале должно соответствовать количеству компонентов анализируемой смеси, дающих независимые друг от друга аналитические сигналы. Применение МГК сопровождается значительным сжатием данных – с нескольких тысяч предикторов до единиц или десятков ГК. Если каждая строка \mathbf{X} представляет собой спектр соответствующего образца, то строка матрицы \mathbf{P}^t ($a \times j$) показывает сигналы, которые вносят существенный вклад в данную ГК, и, соответственно, применительно к спектроскопическим данным часто называются «спектром» этой ГК. Спектр каждого

образца представляет собой линейную комбинацию ГК, а матрица T содержит коэффициенты для этих комбинаций.

МГК не требует априорных сведений о структуре данных. Вместе с тем он относится к методам формального моделирования, т.е. ГК не обязательно имеют физический смысл. В частности, обработка спектральных данных может давать ГК с отрицательными участками. Тем не менее, анализ ГК и матрицы счетов может быть очень полезен для исследования данных. Помимо анализа нагрузок (вклада в них исходных сигналов), изучают взаимное расположение образцов на графиках счетов выбранных ГК (как правило, двух- или трёхмерных). Расстояние между точками зависит от степени сходства образцов. Если расстояние мало, то образцы похожи между собой. Точки могут объединяться в группы, на чём основаны подходы к классификации образцов (рис. 1.8, *a*; см. также [240]).

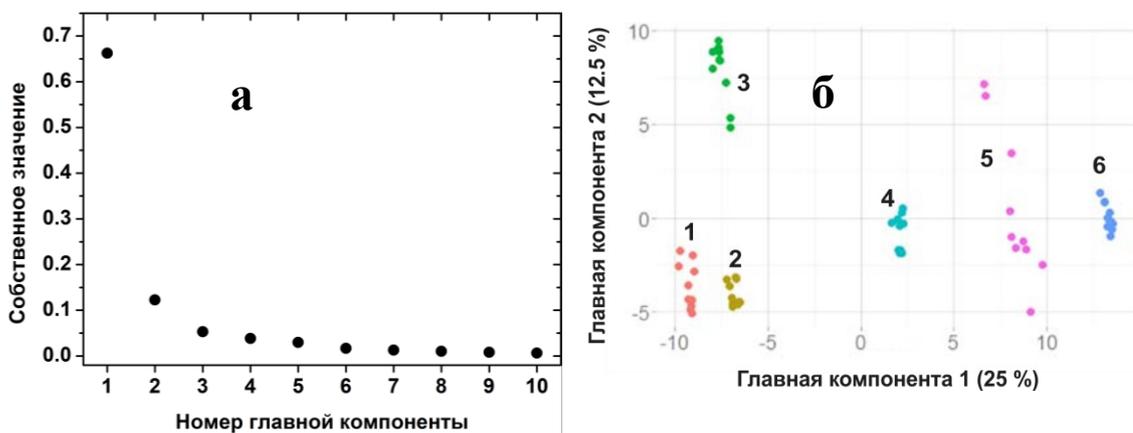


Рис. 1.8, *a*: пример графика собственных значений ГК; *б*: дискриминация образцов бактерий на графике счетов МГК, построенного по данным ЛИЭС и СКР (1: *Staphylococcus (S.) pseudointermedius*, 2: метициллинрезистентный *S. aureus* (штамм ССМ 4750), 3: метициллинчувствительный *S. aureus* (штамм ССМ 3953), 4: *Escherichia coli*, 5: *S. aureus* (штамм ССМ 4223), 6: *S. sciuri*) [240].

Ключевым вопросом практического использования МГК и других методов разложения матриц является выбор числа ГК. Для этого нет чёткого правила, но существует несколько подходов. Один из них основан на том, что собственные значения (т.е. длины векторов) ГК убывают от первой ГК к последней; поэтому рекомендуют считать значимыми только те ГК, собственные значения которых больше, чем среднее арифметическое собственных значений всех ГК (число которых равно числу образцов). Также распространён способ, когда зависимость собственного значения от номера компоненты наносят на график и определяют место излома ниспадающей зависимости, после которого она становится гораздо более полой. Числом ГК при этом считают число

точек до излома включительно. Кроме того, полезно изучение графика зависимости объяснённой дисперсии

$$1 - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J e_{ij}^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij}^2}, \quad (27)$$

где e_{ij} и x_{ij} — элементы матриц \mathbf{E} и \mathbf{X} соответственно, от числа рассматриваемых компонент. Первая ГК вносит наибольший вклад в объяснённую дисперсию; вклады остальных ГК уменьшаются с увеличением их номера. Чем больше ГК берут в расчёт, тем больше объяснённая дисперсия приближается к 1, но это приближение сильно замедляется начиная с некоторой компоненты. Её и можно считать последней (рис. 1.8, б) [241,242].

Аппарат МГК может быть использован для *предсказания* данных путём построения многомерных регрессионных моделей с использованием типичного для методов машинного обучения подхода по формированию обучающего и тестового наборов данных, для которых известно значение искомого параметра (как правило, проверочный набор заменяют использованием кросс-валидации). Например, в методе регрессии на главных компонентах (РГК) порядок действий состоит в следующем. Аналитические сигналы от обучающего набора образцов (например, интенсивности на определённых длинах волн) составляют матрицу предикторов \mathbf{X} , а концентрации компонентов — матрицу *откликов* \mathbf{C} . Тогда можно записать следующее матричное уравнение:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T = \mathbf{CS}, \quad (28)$$

где \mathbf{S} — матрица спектров (сигналов) чистых компонентов.

Для проверочного набора снова записывают уравнение (28), сохраняя в нём уже рассчитанные матрицы \mathbf{P}^T и \mathbf{S} . Решая уравнение относительно \mathbf{C} , находят матрицу концентраций и сравнивают её с известными концентрациями проверочного набора (чаще всего с помощью расчёта среднеквадратичных ошибок [243]). Если результат сравнения удовлетворительный, переходят к анализу неизвестных образцов тем же способом.

Широко распространена также регрессия на латентных (скрытых) структурах (РЛС) [244]. Метод РЛС отличается от РГК тем, что разложение на главные компоненты выполняют не только в отношении матрицы \mathbf{X} , но и для матрицы \mathbf{C} [36,237]. Многомерные градуировки успешно применяются при анализе редкоземельных руд, сталей и многих других объектов [244–246].

Одной из задач хемометрики является т.н. слепое разделение сигналов. Представим себе систему, в которую поступают сигналы от нескольких источников. Система

осуществляет смешение сигналов. Задача состоит в том, чтобы по сигналу, поступающему из системы, восстановить форму исходных сигналов и пропорции, в которых они перемешиваются. Например, в электроэнцефалографии отдельными источниками являются сигналы мозговой активности, а также движения глаз и мышц. Головной мозг осуществляет их смешение, а детектирование производится установленными на голове электродами. Задача состоит в том, чтобы вычленил исходные сигналы, поступавшие из разных областей головного мозга [247]. Другой пример — установление пропорций растворённых в природной воде органических веществ (аминокислот и гуминовых кислот) по суммарному спектру флуоресценции [248,249].

Метод неотрицательного матричного разложения (НМР), предложенный в 1990-х гг. — один из методов слепого разделения сигналов. Он заключается в разложении исходной матрицы данных на неотрицательные компоненты. Такое ограничение помогает получить компоненты, имеющие физический смысл. Задача НМР может быть сформулирована следующим образом: имеется матрица \mathbf{X} с m предикторами (в m строках) и n образцами (в n столбцах). Необходимо разложить её на множители \mathbf{W} ($m \times n$) и \mathbf{H} ($p \times n$), $p < \min(m, n)$:

$$\mathbf{X} = \mathbf{WH} + \mathbf{E}. \quad (29)$$

Столбцы \mathbf{W} называются базисными векторами, а строки \mathbf{H} содержат коэффициенты разложения (каждой компоненте соответствует своя строка); \mathbf{E} — матрица остатков. Алгоритмы расчёта работают так, чтобы норма матрицы \mathbf{E} была минимальной. В первом опубликованном варианте алгоритма [250] сначала задавали фиксированную матрицу \mathbf{H} , затем рассчитывали матрицу \mathbf{W} методом градиентного спуска, минимизируя норму $\|\mathbf{X} - \mathbf{WH}\|$. Все отрицательные значения в ячейках матрицы \mathbf{W} заменяли нулями, фиксировали её и рассчитывали матрицу \mathbf{H} . Эти операции повторяли много раз до сходимости. Впоследствии были разработаны и другие реализации алгоритма НМР [241,247].

Так как в НМР все элементы матриц неотрицательны, не может происходить исчезновения каких-либо компонент, имеющих равные модули и противоположные знаки, как это может быть, например, в МГК. Метод НМР нашёл применение в астрономии [251], нейрофизиологии [247], анализе текста и звука [252,253], распознавании образов [254]. Недостаток НМР (как, впрочем, и МГК) — неединственность решения. Добавим в разложение матрицу \mathbf{B} :

$$\mathbf{WH} = \mathbf{WBB}^{-1}\mathbf{H}. \quad (30)$$

Если произведения $\mathbf{W}' = \mathbf{W}\mathbf{B}$ и $\mathbf{H}' = \mathbf{B}^{-1}\mathbf{H}$ неотрицательны, то они образуют другую параметризацию разложения [255]. Кроме того, результат зависит от начальных приближений \mathbf{W} и \mathbf{H} . Чтобы убедиться в устойчивости решения, рекомендуют запускать алгоритм разложения 10–1000 раз со случайно выбранными начальными приближениями [254,256]. Выбор числа компонент в НМР является важным и трудно формализуемым вопросом так же, как и в МГК. При этом, в отличие от МГК, число компонент в НМР нужно выбирать до расчёта, и его результат будет зависеть от этого выбора; объяснённая дисперсия в НМР не убывает монотонно с увеличением номера компоненты, а одни и те же векторы матрицы \mathbf{W} могут появляться в разном порядке (по крайней мере, так работает изначально предложенный алгоритм [250]). Самый простой путь — сначала выполнять разложение методом МГК, определять число статистически значимых ГК одним из вышеописанных способов и проводить НМР с тем же числом компонент.

Метод НМР по своим постулатам близок к семейству т.н. методов разрешения кривых (МПК, англ. MCR), применяемым преимущественно для анализа спектров смесей веществ, полученных с временным разрешением в процессе протекания химической реакции. В МПК, как и в НМР, присутствует требование неотрицательности компонент, а также могут быть дополнительные требования (например, присутствие заданного числа максимумов в спектре, соответствие формы пиков определённой функции) [257,258].

Для разделения сигналов используется также т.н. анализ независимых компонент (АНК) [249,259]². Задача АНК формулируется следующим образом. Пусть наблюдаемые сигналы \mathbf{X} , являющиеся комбинацией сигналов источников \mathbf{S} , связаны следующими соотношениями:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{S}, \hat{\mathbf{S}} = \mathbf{W}\mathbf{X}, \quad (31)$$

где $\hat{\mathbf{S}}$ — оценки исходных сигналов (результат анализа), \mathbf{A} — матрица, описывающая их сигналов, тогда как \mathbf{W} , наоборот, описывает разделение смеси сигналов и приближается к \mathbf{A}^{-1} . Ранг матрицы \mathbf{A} соответствует числу источников. Векторы матрицы \mathbf{W} должны быть статистически независимы [241,260]. Порядок следования компонент не имеет значения. Компоненты рассчитываются с точностью до знака и постоянного коэффициента.

² В русскоязычной литературе встречается также термин «метод независимых компонент», аббревиатура которого должна выглядеть как «МНК». Однако, во избежание смешения с давно и широко используемым термином «метод наименьших квадратов», мы будем пользоваться термином «АНК».

Как и НМР, АНК не предполагает ортогональности компонент (действительно, физически осмысленные компоненты вовсе не обязательно должны быть ортогональными), что ведёт к неопределённости решения [260]. Взамен ортогональности вводится требование независимости компонент, которое математически реализуется через максимальное удаление компонент от многомерного гауссовского распределения. АНК успешно применяется при обработке данных флуоресцентной, ИК-спектроскопии, СКР, спектроскопии ЯМР, хроматографии и электрохимии [249,261].

Когда одни и те же объекты изучают различными методами, получается набор из нескольких блоков данных различной природы, которые целесообразно анализировать как единое целое. Для этого существуют различные подходы к сочетанию данных, которые классифицируют на алгоритмы низкого, среднего и высокого уровня. Сочетание на высоком уровне подразумевает независимую обработку блоков данных, и только интерпретация результатов проводится совместно. При низкоуровневом сочетании, наоборот, сразу происходит объединение исходных разнородных данных в одну матрицу (возможно, после соответствующей подготовки каждого блока) и её преобразование в соответствии с каким-либо алгоритмом (например, МГК). Методы разрешения кривых также производят низкоуровневое сочетание. Сочетание среднего уровня означает, что блоки данных сначала подвергают факторизации каким-либо методом отдельно друг от друга, а затем главные компоненты из разных блоков объединяют и интерпретируют совместно [4].

Одним из первых многоблоковых методов был консенсусный МГК (англ. СРСА), или просто многоблоковый МГК (англ. МВРСА), реализующий сочетание данных на среднем уровне. Алгоритм направлен на поиск общих («глобальных») векторов ГК, «согласованных» между всеми блоками данных $X_1 \dots X_b$. Столбец одного из блоков принимают в качестве начального приближения и называют общим вектором счетов (англ. super score) t_T . Далее относительно этого вектора проводится регрессия всех блоков X_b , откуда получают нагрузки p_b . Из этих нагрузок рассчитываются внутриблоковые счета t_b , которые затем объединяют в новый блок T . Далее регрессией t_T на T получают матрицу весов w_T , описывающую вклад счетов каждого блока в общий вектор счетов. Матрицу весов нормируют на единицу и рассчитывают новый t_T . Эти операции повторяют до сходимости. Матрица весов отражает вклады каждого блока X_b в каждую из ГК. Извлечение следующих ГК осуществляют путём регрессии t_T на всех блоках X_b ; получающиеся остатки используют для расчёта новых (ортогональных) общих векторов счетов [262].

Одним из алгоритмов, где производится сочетание среднего уровня, является предложенный в 1995 г. исследователями из Франции т.н. анализ с использованием общих компонент и удельных весов (фр. *analyse en composantes communes et poids spécifiques*, англ. *common component and specific weights analysis*), сокращённо называемый ComDim [263]. Он позволяет работать с несколькими блоками данных (например, спектрами эмиссии и КР, хроматограммами) без объединения их в одну матрицу. Для этого ComDim определяет скрытые общие компоненты, присутствующие в каждом блоке, и оценивает, какой вклад (или удельный вес, *salience*) даёт каждый блок в каждую компоненту.

Если каждый из N образцов представлен строкой в блоке данных \mathbf{X}_k , можно определить матрицу \mathbf{W}_k как скалярное произведение $\mathbf{X}_k \mathbf{X}_k^T$. Эту матрицу представляют в виде

$$\mathbf{W}_k = \mathbf{Q} \mathbf{\Lambda}^{(k)} \mathbf{Q}^T + \mathbf{E}_k. \quad (32)$$

Здесь \mathbf{Q} — ортогональная матрица размерностью $N \times N$, содержащая общие компоненты в столбцах. Матрица $\mathbf{\Lambda}^{(k)}$ — диагональная, также имеет размерность $N \times N$ и содержит удельные веса. Для каждого блока \mathbf{X}_k рассчитывается своя матрица $\mathbf{\Lambda}^{(k)}$, в то время как \mathbf{Q} одна и та же для всех блоков. Сумма элементов матрицы $\mathbf{\Lambda}^{(k)}$ показывает, какой вклад рассматриваемый блок данных вносит в \mathbf{Q} [264].

В рамках алгоритма ComDim компоненты рассчитываются одна за другой, ступенчато. Расчёт самих компонент может быть выполнен с помощью МГК или АНК [249]. Выбор числа ГК в случае использования ComDim–АНК несколько менее очевиден, чем для ComDim–МГК. В последнем случае выбирают компоненты с наибольшими вкладами (суммами элементов $\mathbf{\Lambda}^{(k)}$).

Алгоритм ComDim в настоящее время всё ещё активно разрабатывается. Его гибкость обещает быть востребованной в контроле промышленных процессов. Кроме того, разработаны варианты ComDim для задач регрессии и классификации [265].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Настоящая работа посвящена анализу зоопланктона методами ЛИЭС и СКР. Исследование состоит из двух взаимосвязанных частей: 1) оценка вещественного состава, валовый элементный анализ зоопланктона; и 2) совместный анализ данных ЛИЭС и СКР методами хемотрики для выявления взаимосвязей между элементным и вещественным составом организмов зоопланктона (исследовательский анализ). Первая часть работы выполнена на собранной в нашей лаборатории экспериментальной установке.

Вторая часть работы выполнена в рамках сотрудничества с Университетом г. Сегеда (Венгрия) на серийно выпускаемом оборудовании, предназначенном для локального анализа методами СКР и ЛИЭС с высоким пространственным разрешением. Подробное описание образцов, методов и подходов дано в следующих подразделах.

2.1. Анализируемые образцы.

2.1.1. Общая характеристика морского зоопланктона

Среди морского зоопланктона высоких широт доминирующее положение занимают веслоногие рачки (копеподы) рода *Calanus*. Они являются связующим звеном между первичными продуцентами (фитопланктоном) и высшими звеньями пищевой цепи, внося таким образом значительный вклад в потоки энергии в морской экосистеме. Для этих организмов характерна т.н. диапауза, когда в холодное время года они погружаются на большую глубину (более 500 м), входя в состояние спячки. Механизм регуляции плавучести не вполне ясен. Возможно, что он основан на изменении плотности липидов, находящихся в специальном жировом мешке, в зависимости от давления воды при погружении. Кроме того, плотность организма может изменяться вследствие обмена тяжёлых ионов на более лёгкие — например, обмена Na^+ на NH_4^+ . Помимо ионов аммония, плотность межклеточной среды могут снижать и ионы лития. Содержание лития в морской воде составляет 28 мкмоль/л (около 200 мкг/л), в то время как в каляноидах его может быть на 2–3 порядка больше. (Примечательно, что накопление Li наблюдается только в Северном полушарии). Так как накопление лития через пищевую цепь или пассивно из окружающей среды маловероятно, следует предполагать наличие механизма активного накопления элемента. Поэтому литий уже нельзя считать элементом, не имеющим биологической функции (как это считалось ранее). Эта функция нуждается в прояснении [266–268].

Общее содержание минеральных компонентов в зоопланктоне колеблется в широких пределах. При этом для каждого биологического вида характерны свои определённые содержания воды, азота и зольность [269]. Элементный анализ зоопланктона

проводят методами ИСП–АЭС или ИСП–МС после разложения в смеси HNO_3 и H_2O_2 [267,268]. Ряд катионов (Li^+ , NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+}) поддаётся определению методом ионной хроматографии с кондуктометрическим детектором [266,270].

Главными компонентами тканей копепод с точки зрения молекулярного состава являются белки, жиры и хитин [266,271]. Кроме того, тела ракообразных окрашены каротиноидными пигментами, сигналы которых (наряду с сигналами алифатических и ненасыщенных жирных кислот) очень интенсивны в спектрах поглощения и/или КР (например, [272–274]).

2.1.2. Описание анализируемых образцов

В работе использовались образцы зоопланктона, отобранного в морях Северного Ледовитого океана и в Чёрном море в ходе экспедиций Института Океанологии им. П.П. Ширшова РАН (ИО РАН) в 2014–2017 гг. (сезон лова — с августа по октябрь). Животные преимущественно представляли собой ракообразных размером от 2 до 20 мм, среди которых преобладали представители родов *Calanus* и *Thysanoessa* (Таблица 2.1), принадлежащих к классам веслоногих и высших раков, соответственно. Животных промывали деионизованной водой, сушили 12 ч при 50°C , при необходимости измельчали пинцетом и прессовали в таблетки диаметром 8–10 мм при умеренном давлении (20–30 бар). При высоком давлении происходит потеря жидкого жира и растекание самого образца. Стандартные образцы прессовали при 1000 бар. Так как поверхность таблеток из зоопланктона была неоднородна, при исследовательском анализе локальными методами мы различали тёмные, светлые и промежуточно окрашенные участки (Рисунок 2.1), а при определении валового состава усредняли спектры от многих точек на поверхности. В нашем распоряжении имелись данные элементного анализа этих образцов методами ИСП–АЭС и ИСП–МС, предоставленные ИО РАН (см. Приложение 1). Основные неорганические компоненты исследованных образцов — Ca, K, Na и P (до 1.9; 1.6; 4.4 и 1.3 масс. %, соответственно). Кроме того, мы пользовались стандартными образцами состава животных и растительных тканей (Таблица 2.2).

Таблица 2.1. Характеристики образцов зоопланктона. Через косую черту указаны характеристики поверхностной и придонной воды.

№	Место вылова	Биологическое название	Географические координаты	Солёность, ПЕС*	t, °C
1	Море Лаптевых	<i>Calanus</i>	77.170° с.ш., 114.667° в.д.	32.17/33.86	1.91/–1.63
2	Сев. Лед. океан	<i>Calanus hyperboreus</i>	85.257° с.ш., 60.026° в.д.	нет данных	
3	Карское море	<i>Thysanoessa raschii</i>	74.710° с.ш., 59.767° в.д.	23.72/34.45	4.39/–1.05

№	Место вылова	Биологическое название	Географические координаты	Солёность, ПЕС*	t, °C
4	з. Благополучия (Н. Земля)	<i>Calanus</i>	75.671° с.ш., 63.711° в.д.	33.05/34.39	-0.85/-1.44
5	Эстуарий р. Обь	<i>Limnocalanus macrurus</i>	73.698° с.ш., 72.572° в.д.	2.11/28.55	5.25/-0.35
6		<i>Mysis oculata</i>	73.698° с.ш., 72.572° в.д.	2.11/28.55	5.25/-0.35
7	Карское море	<i>Thysanoessa raschii</i>	71.125° с.ш., 58.298° в.д.	32.42	-1.27
8		<i>Limacina helicina</i>	72.413° с.ш., 65.445° в.д.	33.48	-1.64
9	Море Лаптевых	<i>Mysis oculata</i>	73.333° с.ш., 130.500° в.д.	17.79/31.57	5.1/-0.64
10		Смесь видов	77.100° с.ш., 130.500° в.д.	21.64/34.0	3.59/-1.51
11, 18	Карское море	<i>Thysanoessa raschii</i>	74.543° с.ш., 58.277° в.д.	23.88/34.29	2.45/-1.08
12			Баренцево море	74.488° с.ш., 46.180° в.д.	33.45
13	Эстуарий р. Обь	<i>Mysis oculata</i>	73.698° с.ш., 72.572° в.д.	2.11/28.55	5.25/-0.35
14	Карское море	<i>Thysanoessa raschii</i>	74.628° с.ш., 59.300° в.д.	21.64/34.31	4.07/-1.12
15			72.543° с.ш., 55.510° в.д.	26.79/33.88	4.85/-0.94
16	Сев. Лед. океан	<i>Calanus hyperboreus</i>	86.829° с.ш., 61.867° в.д.	нет данных	
17	Карское море	<i>Calanus glacialis</i>	73.100° с.ш., 63.317° в.д.	31.28/34.33	4.9/-0.71
19	Море Лаптевых	<i>Calanus</i>	75.417° с.ш., 115.417° в.д.	21.53/33.60	3.45/-1.34
20	Эстуарий р. Хатанга	<i>Limnocalanus macrurus</i>	73.500° с.ш., 108.167° в.д.	3.49/9.79	3.62/4.13
21	Чёрное море	<i>Calanus euxinus</i>	43.955° с.ш., 37.457° в.д.	нет данных	
22			нет данных		
23			43.684° с.ш., 32.418° в.д.		
24			43.263° с.ш., 39.682° в.д.		
25			42.887° с.ш., 37.624° в.д.		
26	Море Лаптевых	<i>Parasagitta elegans</i>	77.170° с.ш., 114.667° в.д.	32.17/33.86	1.91/-1.63
27	Вост.-Сиб. море		75.633° с.ш., 162.000° в.д.	30.14/31.84	0.69/-1.65
28†	Карское море	<i>Thysanoessa raschii</i>	74.710° с.ш., 59.767° в.д.	23.72/34.45	4.39/-1.05
29†	Вост.-Сиб. море	<i>Calanus</i>	75.817° с.ш., 169.461° в.д.	нет данных	
30†	Сев. Лед. океан	<i>Calanus hyperboreus</i>	87.007° с.ш., 55.794° в.д.		
31†	Море Лаптевых	<i>Calanus</i>	78.367° с.ш., 130.500° в.д.	30.08/34.51	2.03/-1.04

*ПЕС — практические единицы солёности, используемые при определении солёности воды методом кондуктометрии [275].

†В разделе 3.1 образцы 28–31 будут именоваться так: планктон из залива Седова (сокращённо — «Седов»), АТ-71, № 5 и № 5225, соответственно.

Таблица 2.2. Элементный состав стандартных образцов³. Все образцы произведены Институтом геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, кроме IAEA-407, созданного МАГАТЭ.

Название	Бок-2*	IAEA-407**	ЭК-1***	ЛБ-1†	Тр-1‡
Al, мкг/г	н/д	13.8±1.4	990±120	830±100	370±50
B, мкг/г	н/д	н/д	33	50±10	11.2±1.2
C, %	н/д	н/д	35	48	42
Ca, %	0.17±0.03	2.70±0.13	2.80±0.17	1.60±0.09	0.67±0.03
Fe, мкг/г	54±11	146±3	2600±100	730±70	970±50
K, %	1.55±0.08	1.31±0.09	3.22±0.16	0.71±0.04	1.38±0.03
Li, мкг/г	н/д	0.685±0.065	1.44±0.18	0.73±0.09	0.55±0.09
Mg, %	0.103±0.012	0.272±0.014	0.32±0.02	0.44±0.03	0.24±0.02
Na, %	0.28±0.01	1.31±0.06	0.68±0.05	0.018±0.003	0.075±0.006
P, %	0.95±0.05	н/д	0.24±0.03	0.154±0.006	0.22±0.01
Si, %	н/д	н/д	1.1±0.2	0.40±0.07	0.55±0.04
Sr, мкг/г	2.8±0.3	130±5	174±9	72±7	28.0±0.9
Zn, мкг/г	23±2	67.1±0.8	20.6±1.4	94±6	23.6±1.1
ППП, %	95	н/д	86.6	94.3	94.5

*Мышечная ткань байкальского окуня; **Обезжиренная сельдь (Северное море).

***Элодея канадская (водное растение); †Лист берёзы; ‡Травосмесь.

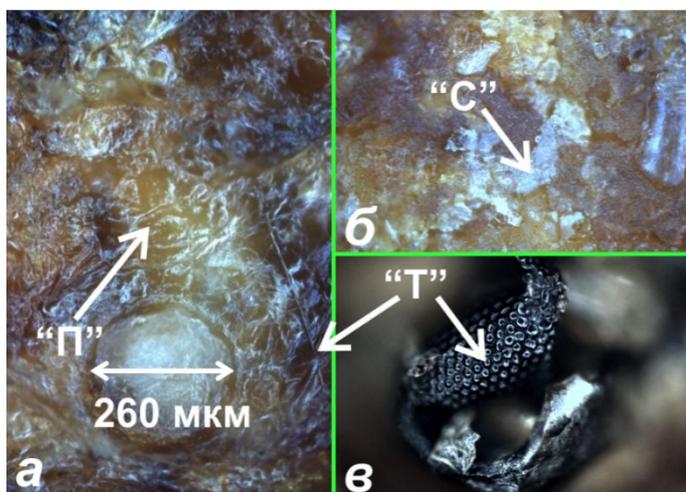


Рисунок 2.1. Микрофотографии таблеток из зоопланктона,

а: смесь разных видов зоопланктона (образец 10) и лазерно-абляционный кратер;

б: *Calanus hyperboreus*;

в: *Thysanoessa raschii*.

«Т»: тёмный материал,
«П»: материал промежуточной окраски,
«С»: светлый материал.

³ Полная информация об этих СО размещена по адресам <http://igc.irk.ru/ru/uslugi/eksperimentalnye-obraztsy>, https://nucleus.iaea.org/rpst/Documents/rs_iaea-407.pdf.

2.2. Лабораторная установка для лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии

Схема установки для ЛИЭС и их характеристики приведена на Рисунке 2.2, технические характеристики основных узлов — в Таблице 2.3. Излучение 3-й или 4-й гар-

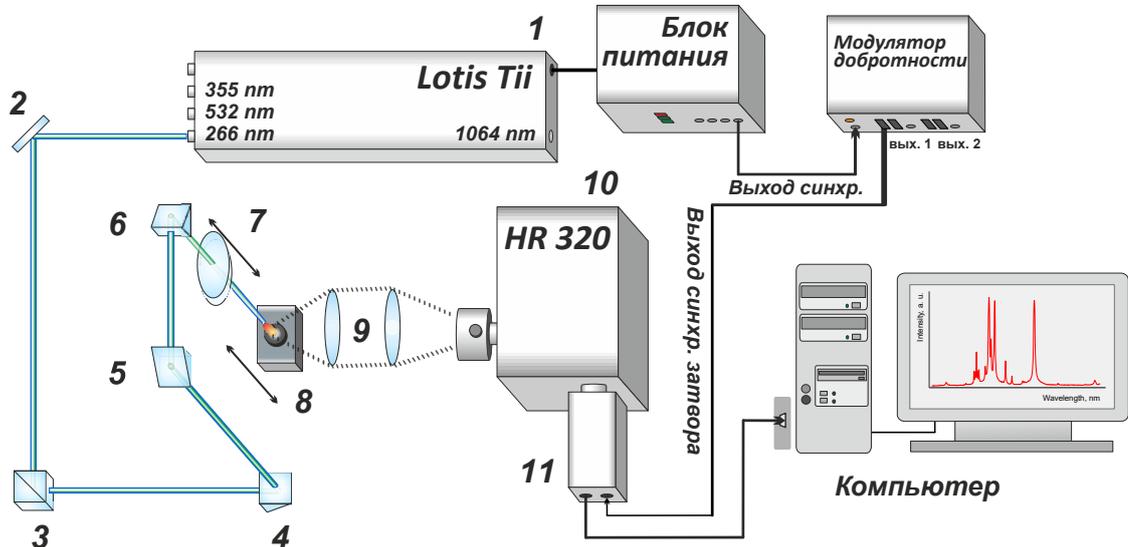


Рис. 2.2. Схема установки для лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии.

моник Nd:YAG лазера 1 (5 Гц, 24-25 мДж) направляли на образец с помощью диэлектрического зеркала 2, поляризационного куба 3, кварцевых призм 4, 5, 6. Пучок фокусировали ахроматическим объективом на 5 мм ниже поверхности образца для воспроизводимой абляции [276]. Образец помещали на двухкоординатный столик, который позволял устанавливать необходимую высоту поверхности образца, чтобы излучение плазмы находилось на оси кварцевого двухлинзового конденсора 9, проецирующего его на входную щель (25 мкм) спектрографа Черни-Тёрнера 10. Регистрация спектров осуществлялась стробируемой ПЗС-камерой НАНОГЕЙТ-2В с усилителем яркости. Для управления камерой, визуализации и записи спектров в файл использовали программное обеспечение, разработанное ранее в лаборатории [44,103]. Дальнейшую обработку данных производили в программных пакетах Origin, GNU Octave, Wolfram Mathematica и Microsoft Excel. В работе использовали интегральные интенсивности спектральных линий, для расчёта которых их контуры аппроксимировали функцией Лоренца.

Таблица 2.3. Основные узлы экспериментальной установки.

Название узла	Основные характеристики
Nd:YAG лазер с ламповой накачкой LOTIS ТП LS-2134UTF (Беларусь).	Накачка: ламповая, $v_{\max} = 15$ Гц, $\tau = 6$ нс (ПШПВ). Модовая структура: кольцевая, $d = 6.3$ мм. Энергия импульса: $\lambda = 532$ нм, $E \leq 170$ мДж; $\lambda = 355$ нм, $E \leq 60$ мДж; $\lambda = 266$ нм, $E \leq 40$ мДж
Спектрограф	HR 320 (ISA Instruments, США): $f = 320$ мм, $f/D = 1/4$, отражающая решётка 1800 штр./мм, разрешение 10800 ($\lambda = 589$ нм)
Камера	«Наногейт-2В» (НПП «Наноскан», Россия). Диапазон чувствительности: 205–900 нм, строб 0.01–20 мкс, задержка регистрации 0.04–1300 мкс, время экспозиции ПЗС 3 мкс – 502 с

2.3. Спектрометр Applied Spectra

Спектры ЛИП (для совместного анализа данных спектроскопии КР и ЛИЭС) регистрировали с помощью спектрометра Applied Spectra J200 Tandem LA-LIBS instrument (Applied Spectra, США), позволяющего регистрировать спектры лазерно-индуцированной плазмы в диапазоне 186–1049 нм с разрешением около ~ 3000 . В этом приборе для испарения пробы используется 4-я гармоника Nd:YAG лазера ($\lambda = 266$ нм), регистрация спектров осуществляется с помощью ПЗС-камеры. В наших экспериментах были установлены следующие настройки: энергия импульса 20 мДж, частота 10 Гц, задержка регистрации 500 нс, время сбора сигнала 3 мкс. Размер пятна, образуемого сфокусированным лазерным пучком на поверхности образца, составлял 200 мкм. Фокусировка производилась автоматически с помощью встроенного оптического сенсора или видеокамеры, трёхкоординатный столик позволял выбирать точку на поверхности образца с точностью до 0.05 мм. Мы регистрировали не менее 3 спектров в точке каждого цвета (см. раздел 3.1), т.е. не менее 9 спектров для каждого образца. При регистрации спектров проводилось усреднение сигнала для 10 лазерных импульсов.

2.4. КР-микроскоп Thermo Scientific DXR

Регистрацию спектров КР осуществляли с помощью прибора, КР-микроскопа Thermo Scientific DXR, работающего и в режиме традиционного оптического микроскопа, и в качестве КР-спектрометра. Источником излучения являлся непрерывный диодный лазер ($\lambda = 780$ нм, энергия 1–14 мВт). Размер пятна при фокусировке на

поверхности пробы составлял 1–2 мкм. Регистрация спектров производилась в диапазоне 450–3150 см⁻¹ (разрешение 4 см⁻¹) ПЗС-детектором с термоэлектрическим охлаждением (-50° С). В зависимости от интенсивности сигнала использовали различные входные апертуры: отверстия диаметром 25 и 50 мкм, а также щели такой же ширины. Время накопления спектра варьировалось от 30 с до 5 мин. Вычитание сигнала флуоресценции производилось автоматически программным обеспечением прибора (фон описывался многочленом 6-й степени). На участках каждого цвета (тёмные, светлые, промежуточной окраски) мы записывали не менее 3 спектров КР, т.е. не менее 9 спектров для каждого образца.

2.5. Предварительная обработка спектров

Для осуществления рутинных операций по удалению фона и оценке выбросов перед усреднением спектров было разработано вспомогательное ПО.

2.5.1. Программа для исключения выбросов.

Анализ биологических образцов обычно представляет трудности в силу сложного и изменчивого состава их матрицы, а также её неоднородности. В связи с этим воспроизводимость сигнала невысока (стандартное отклонение порядка 40 %). Учитывая большой объём спектральных измерений, для автоматического удаления выбросов была написана специальная программа.

Исходными данными является набор спектров для параллельных измерений. Для линий, представляющих интерес, указывается положение её максимума, а также двух точек для линейной коррекции фона. Далее программа отсеивает выбросы по критерию Граббса, рассматривая в качестве выборки множество значений интенсивности на выбранной длине волны (с учётом фона). Критерий применяется последовательно для каждой из выбранных спектральных линий многократно до тех пор, пока статистика не будет превышать критического значения ни для одной из них.

Предусмотрена возможность заранее записать положения линий и точек коррекции фона в файл, не выбирая их вручную. Также при желании можно отсеивать спектры по одному без использования критерия (как самые интенсивные или наименее интенсивные на определённой длине волны).

2.5.2. Программа для корректировки фона в спектрах КР.

Так как автоматическая корректировка фона в программном обеспечении прибора не позволяет полностью удалить мешающий сигнал флуоресценции, была разработана программа для дополнительной корректировки спектров в среде Wolfram

Mathematica (Рисунок 2.3). Спектр КР отображается вместе с определённым числом меток (их было 38), которые задают кусочно-линейный фон. Оператор может менять положение меток мышью. На левой панели находятся элементы управления масштабом. Для удобства работы в верхней части окна происходит перемещение меток оператором, а ниже приводятся весь спектр целиком до и после вычитания фона.

Положения меток можно сохранять и использовать с другими спектрами. Так как метки занимают локальные минимумы спектра (чаще всего в пределах $\pm 10 \text{ см}^{-1}$ от установленного положения), то при переносе на другой спектр они автоматически сдвигаются, корректируя случайные колебания фона.

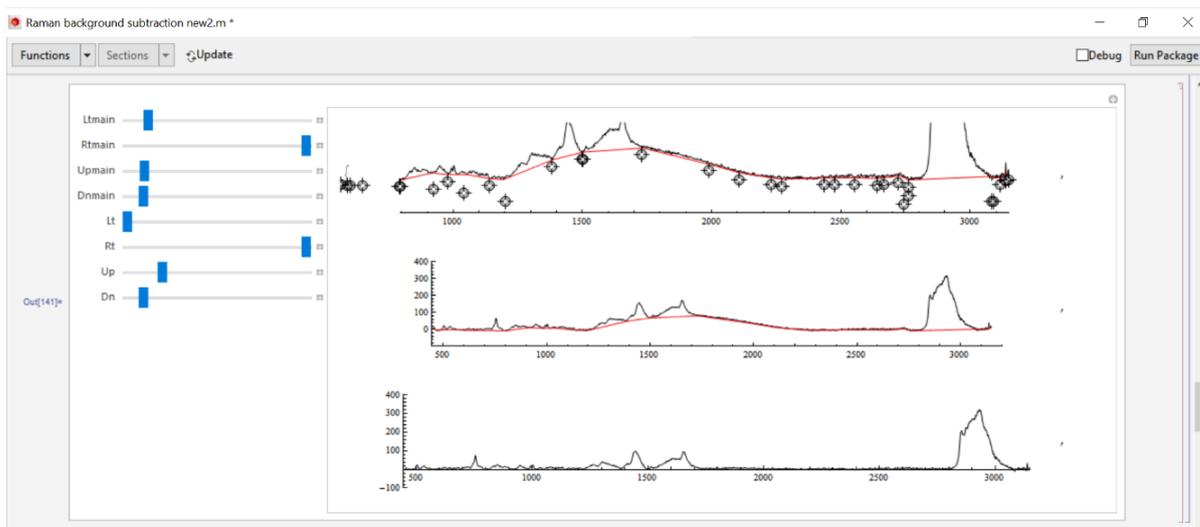


Рисунок 2.3. Программа для ручной корректировки фона в спектрах КР.

2.5.3. Программа для моделирования молекулярных эмиссионных спектров.

В условиях ЛТР температуру источника можно оценивать не только на основании температуры возбуждения (электронной), но и на основании температуры, рассчитываемой для электронно-колебательно-вращательных переходов молекул (в нашем случае рассчитывается колебательная температура, см. уравнения 6 и 7). В качестве диагностической системы мы использовали полосы радикала CN, принадлежащие к фиолетовой системе $B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$ с $\Delta v=0$ при 372–389 нм. Для моделирования спектра мы составили программу в среде GNU Octave в соответствии с рекомендациями [277]. При моделировании учитывали все электронно-колебательно-вращательные уровни, соответствующие колебательным числам от 0 до 9 [278–280], имеющие энергию не выше энергии диссоциации радикала CN (7.5 эВ). Каждому вращательному переходу приписывается лоренцевский профиль, соответствующий аппаратной функции используемого оборудования (около 4.5 см^{-1} в данном диапазоне) с поправкой на ударное уширение, зависящее от температуры. В программе предусмотрено несколько способов расчёта температуры в предположении ЛТР. Первый из них заключается в аппроксимации экспериментальных спектров модельными данными путём перебора значений

температуры (T) в некотором интервале (шириной порядка 3–7 тыс. К) с шагом, заданным оператором (например, 500 К). В каждой точке рассчитывается модельный спектр, производится поправка длин волн (вакуум—воздух), спектр нормируется по интенсивности на интервал $[0,1]$ и сравнивается с нормированным таким же образом экспериментальным спектром путём вычисления суммы квадратов разностей (RSS, residual sum of squares) между спектрами по всем имеющимся длинам волн (точкам). Полученная

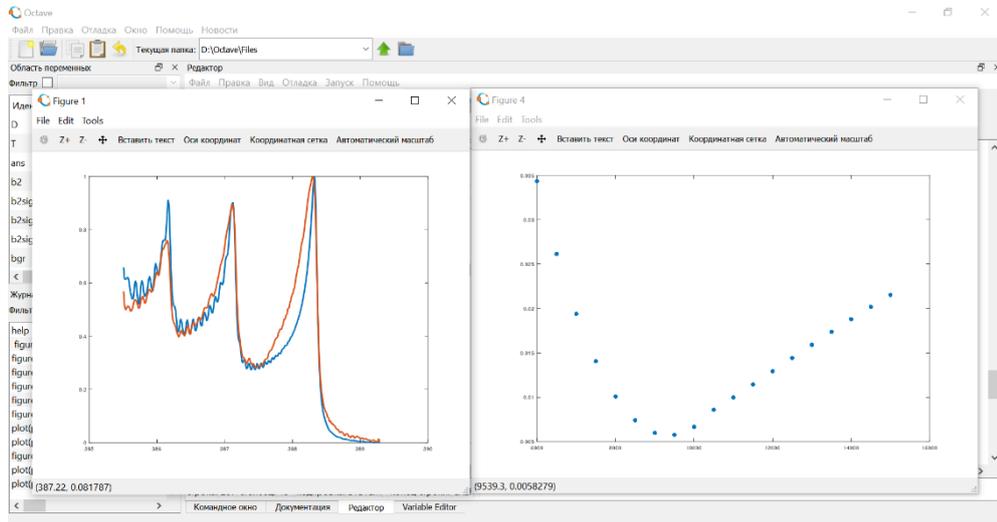


Рисунок 2.4. Пример выдачи программы оптимизации спектра CN. Слева: экспериментальный и модельный спектры (оранжевый и голубой соответственно), справа — зависимость суммы квадратов невязок от T (6–15 тыс. К).

таким образом зависимость RSS от T имеет глобальный минимум, который соответствует наилучшему совпадению экспериментальных и модельных данных, так что положение этого минимума можно считать равным температуре лазерной плазмы (Рисунок 2.4). В программе предусмотрена возможность вычитания линейно изменяющегося фона, а также вырезание из спектра каких-либо участков (например, участков со спектральными помехами от атомных линий). Также предусмотрена оптимизация спектра в условиях неравенства колебательной и вращательной температур методом симплекс-оптимизации.

Другой способ расчёта заключается в построении теоретических номограмм в виде температурной зависимости отношения площадей каких-либо частей спектра, задаваемых оператором, например, полос 0–0 и 1–1 или 2–2 (пределы интегрирования в воздухе

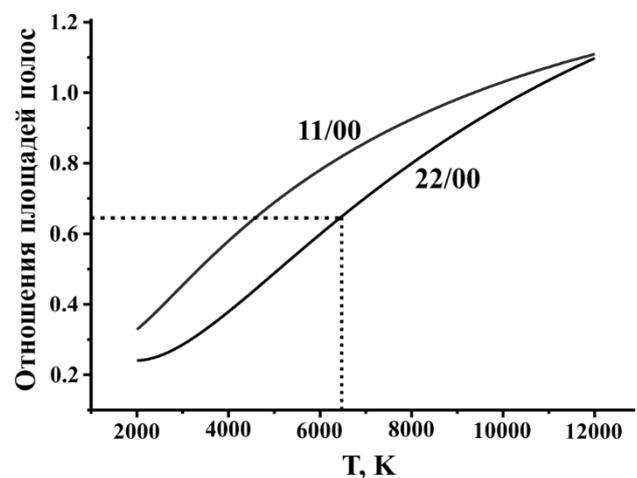


Рисунок 2.5. Теоретически рассчитанные номограммы зависимостей соотношений площадей полос CN от температуры.

387.23–388.42, 386.28–387.23 и 385.52–386.28 нм, соответственно). Номограмма была получена с шагом 25 К в интервале от 2 до 12 тыс. К. Затем вспомогательная программа рассчитывает аналогичное соотношение площадей для экспериментального спектра и определяет значение T по номограмме (Рисунок 2.5, см. также [136]).

2.5.4. Обработка изображений детектора.

Распределение интенсивности сигнала по высоте щели, которая была параллельна лучу испаряющего лазера и, соответственно, оси плазмы, получали следующим образом. Интенсивность каждой строки фотографии детектора (1036 строк \times 1390 столбцов, Рисунок 2.6, *a*) может быть записана в виде отдельного спектра. Учитывая пространственное разрешение двухлинзового конденсора, в количественных расчётах мы делили плазму на три зоны шириной 0.80 мм (83 пикселя) каждая. Эти зоны мы будем в дальнейшем именовать зонами I, II и III (начиная от ближайшей к поверхности мишени). Внутри каждой зоны (83 строки \times 1390 столбцов) осуществляли вертикальное бинирование сигнала. Для уменьшения шума выполняли сглаживание методом скользящего среднего с окном из 15 точек. Интенсивности эмиссионных линий получали

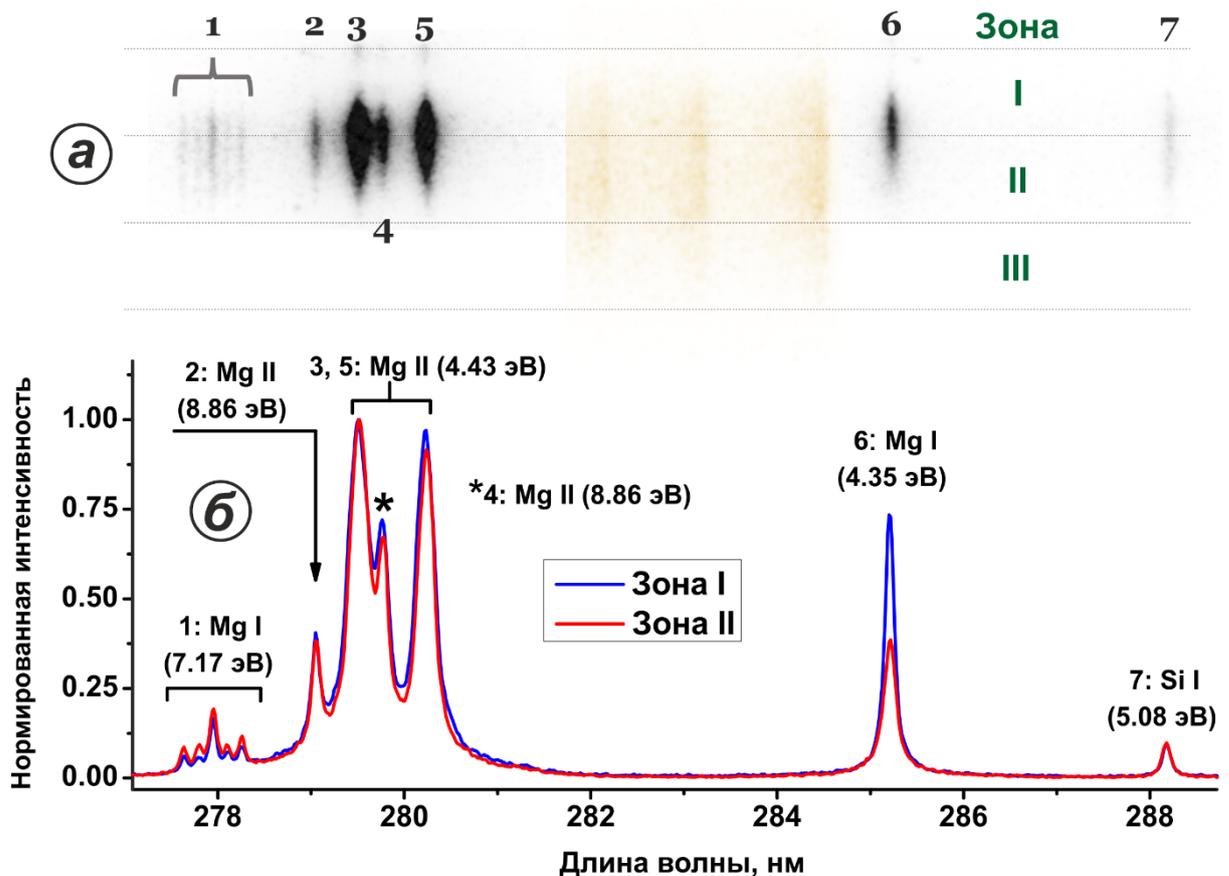


Рисунок 2.6. Спектры образца зоопланктона (АТ-71) в диапазоне 277–289 нм, *a*: изображение фрагмента фокальной плоскости спектрографа с обозначением зон, которые рассматривали в лазерной плазме (для сравнения золотистым цветом изображён спектр CN в диапазоне 386–389 нм); *б*: спектры из зон I и II, нормированные на [0,1].

В скобках указаны энергии верхних уровней переходов (E_i).

путём интегрирования соответствующих профилей методом трапеций в границах полной ширины на половине высоты.

Примеры спектров различных зон плазмы показаны на Рисунке 2.6, б. Можно отметить неодинаковые соотношения интенсивностей атомных и ионных линий, которые указывают на различия в параметрах плазмы между зонами. Также для каждого образца были получены профили общей светимости плазмы в области чувствительности детектора путём наложения его изображений в тринадцати спектральных диапазонах с центрами при 213, 253, 281, 322, 382.5, 402, 426.5, 467, 486, 512, 617, 656 и 674 нм. Спектральная ширина диапазонов изменялась в зависимости от длины волны и составляла 21.7 нм для диапазона с центром при 213 нм, 18.5 нм (при 486 нм) и 15.1 нм (при 674 нм). Обработку изображений детектора проводили в среде Wolfram Mathematica.

2.6. Методики расчёта температуры и электронной плотности плазмы

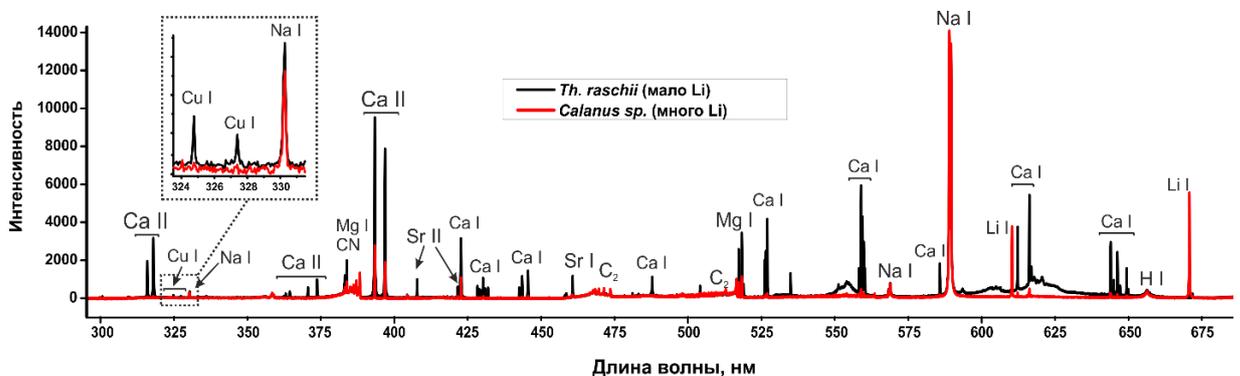


Рисунок 2.7. Сравнение эмиссионных спектров одного из образцов высших раков (чёрная линия) и веслоногих раков (красная линия).

На Рисунке 2.7 изображены обзорные спектры двух образцов зоопланктона, относящихся к веслоногим ракам и высшим ракам. В спектрах преобладают эмиссионные сигналы кальция и магния и молекулярные полосы. Линии других элементов (H, Li, Na, K, Sr и Cu) немногочисленны. Поэтому мы оценивали температуру плазмы, как правило, по линиям кальция и магния, приведённым в Таблице 2.4. Чтобы избежать самопоглощения и ошибок при диагностике плазмы, необходимо выбирать переходы с высоколежащими нижними уровнями. Для численной оценки самопоглощения и выбора линий мы пользовались алгоритмом термодинамического моделирования плазмы в предположении ЛТР, разработанным в лаборатории (см. раздел 2.8).

Таблица 2.4. Параметры [47] эмиссионных линий, использованных для диагностики плазмы.

Частица	λ , нм	E_i , эВ	E_k , эВ	gA , 10^8 с^{-1}
Ca I	612.22	3.9104	1.8858	0.861
	422.67	2.9325	0.0000	6.54
	616.22	3.9104	1.8989	1.43
	429.90	4.7690	1.8858	1.4
	430.25	4.7798	1.8989	6.8
Ca II	373.69	6.4679	3.1510	5.2
	315.89	7.0472	3.1233	12
	317.93	7.0496	3.1510	22
	396.85	3.1234	0.0000	2.8
Mg I	383.23	5.9459	2.7116	2.02
	383.23	5.9459	2.7116	6.05
	383.83	5.9459	2.7166	0.0134
	383.83	5.9459	2.7166	11.3
	383.83	5.9459	2.7166	2.02
	517.27	5.1078	2.7116	1.01
	518.36	5.1078	2.7166	1.68
	277.98	7.1754	2.7166	20.4
	277.98	7.1704	2.7116	4.08
Mg II	279.08	8.8638	4.4224	16
	280.27	4.4224	0.0000	5.14

E_i и E_k : верхний и нижний уровни перехода, соответственно; g : кратность вырождения верхнего уровня; A : вероятность перехода.

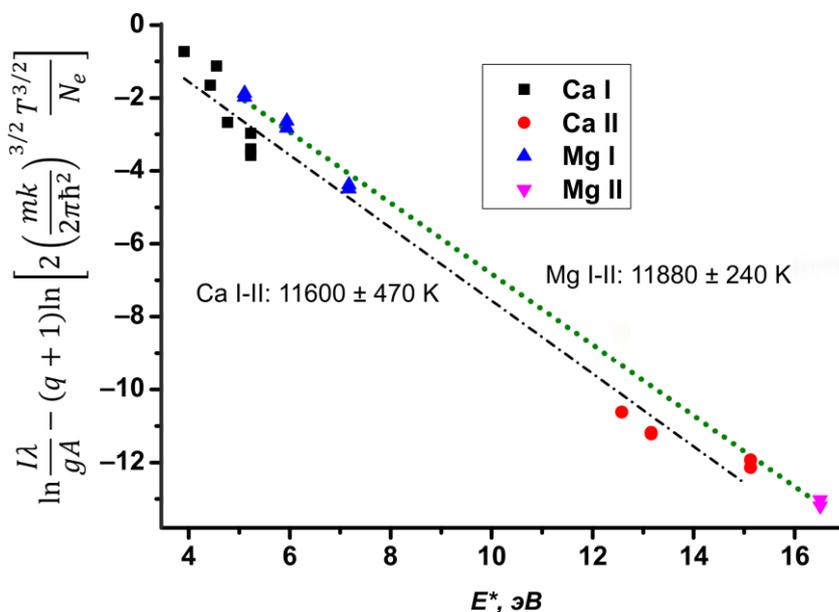


Рис. 2.8. Графики Саха-Больцмана для линий Ca I-II и Mg I-II с соответствующими регрессионными функциями (для зоопланктона из залива Седова).

Для определения температуры по атомным и ионным линиям использовали метод графиков Больцмана с учётом ионизационного равновесия в плазме. В этом случае для расчётов используется уравнение Саха-Больцмана (14). Его графическое представление для линий кальция и магния приведено на Рисунке 2.8. Результаты для кальция и магния совпадали в пределах ошибки эксперимента. Для дальнейших расчётов мы

пользовались только температурами, рассчитанными по сигналам магния, так как их параметры известны с гораздо лучшей точностью, чем параметры линий кальция [47].

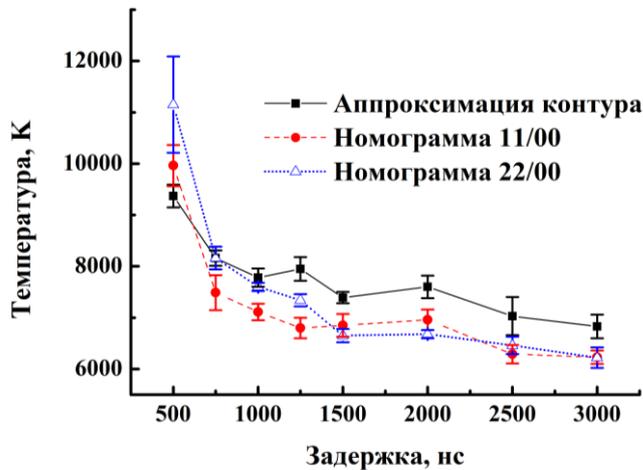


Рисунок 2.9. Изменение во времени температуры плазмы зоопланктона АТ-71, рассчитанной по спектру CN (испарение: $\lambda = 355$ нм) разными способами: путём аппроксимации экспериментального спектра модельным и по номограммам для соотношения полос 1-1/0-0 и 2-2/0-0.

Рисунок 2.9. Изменение во времени температуры плазмы зоопланктона АТ-71, рассчитанной по спектру CN (испарение: $\lambda = 355$ нм) разными способами: путём аппроксимации экспериментального спектра модельным и по номограммам для соотношения полос 1-1/0-0 и 2-2/0-0.

Рисунок 2.9. Изменение во времени температуры плазмы зоопланктона АТ-71, рассчитанной по спектру CN (испарение: $\lambda = 355$ нм) разными способами: путём аппроксимации экспериментального спектра модельным и по номограммам для соотношения полос 1-1/0-0 и 2-2/0-0.

Рисунок 2.9. Изменение во времени температуры плазмы зоопланктона АТ-71, рассчитанной по спектру CN (испарение: $\lambda = 355$ нм) разными способами: путём аппроксимации экспериментального спектра модельным и по номограммам для соотношения полос 1-1/0-0 и 2-2/0-0.

Однако температуры, определённые по сигналам атомов и молекул, могут отличаться. На Рисунке 2.10 изображены зависимости температуры плазмы ГСО БОк-2 (байкальский окунь) от времени задержки, рассчитанные по спектрам CN и Mg I-II. Температура молекул CN снижается медленно, падая всего на 1000 К в течение рассматриваемого временного интервала.

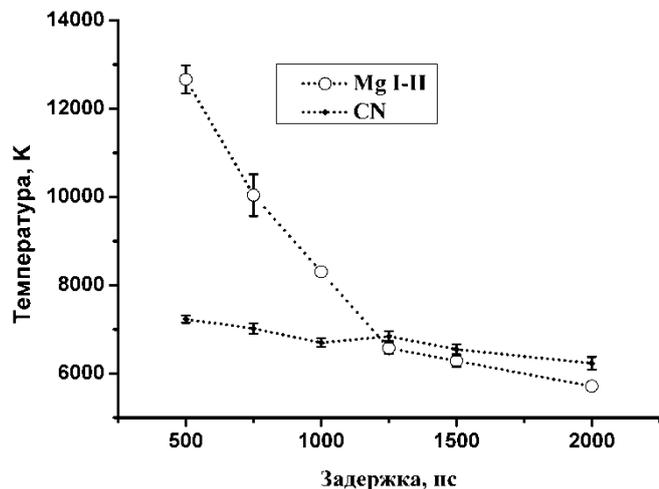


Рисунок 2.10. Изменение во времени температуры плазмы ГСО БОк-2 (испарение: $\lambda = 266$ нм), рассчитанной по сигналам Mg I-II и CN.

Напротив, температура атомов и ионов сначала гораздо выше температуры молекул, но затем резко падает, так что начиная с задержки 1.25 мкс их можно считать почти равными. Поэтому, если количественное определение металлов проводится при больших

Определение температуры по молекулярно-эмиссионным спектрам радикала CN описано в разделе 2.5.3. Спектр полосы CN был удобен тем, что на нашем оборудовании он занимал всего один спектральный диапазон, что позволяло сократить эксперимент. Температуры рассчитывали тремя способами: методом подбора, по номограмме отношения площадей полос 1-1/0-0 и 2-2/0-0. Эти способы дали сходные результаты (Рисунок 2.9); окончательным значением температуры считали среднее арифметическое, полученное из результатов определения по номограммам. Преимущество использования номограмм состоит в меньшем влиянии шумов и помех в экспериментальном спектре, которые могут заметно исказить результаты, основанные на минимизации квадратов невязок.

задержках, можно пользоваться обеими диагностическими системами. Но так как в нашей работе спектры регистрировались с короткими задержками (для достижения необходимого значения отношения сигнала к шуму, см. ниже), то более предпочтительна оценка температуры по линиям магния.

Электронную плотность N_e (см^{-3}) определяли по штарковскому уширению линии H_α серии Бальмера ($\lambda = 656.28$ нм) [54,281] в соответствии с уравнением (18) при $\alpha = 5.14 \times 10^{-12}$ (для температуры 10 000 К). Эта линия наиболее подвержена уширению, поэтому при её использовании минимизируется погрешность оценки N_e .

2.7. Оптимизация условий эксперимента для количественного анализа методом ЛИЭС

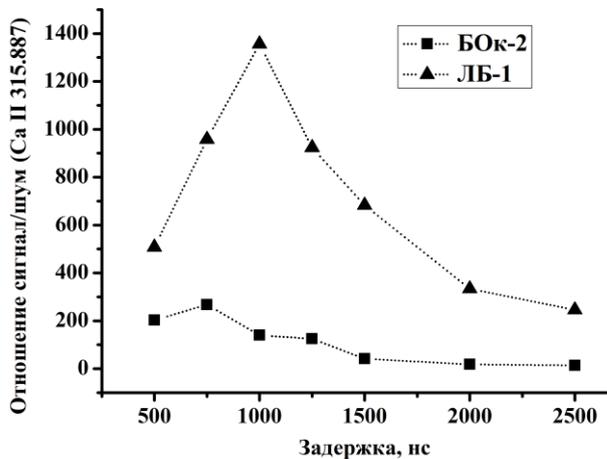


Рисунок 2.11. Зависимость соотношения сигнал/шум для линии Ca II при 315.89 нм от задержки регистрации (строб 10 % от задержки) для ГСО БОк-2 и ЛБ-1 ($\lambda_{\text{исп}} = 532$ нм).

На первом этапе была оценена воспроизводимость сигнала при использовании различных гармоник Nd:YAG лазера (532 нм, 355 нм и 266 нм). При использовании второй гармоники ($\lambda = 532$ нм) спектры характеризовались низким соотношением сигнала к шуму (возможно, из-за малой эффективности атомизации пробы). Поэтому для улучшения качества сигнала приходилось увеличивать энергию импульса до значений порядка 70 мДж, что приводило к увеличению размера кратеров на поверхности, разлёту частиц образца и, соответственно,

слишком большому его расходу. Вероятно, излучение с этой длиной волны проникает в образец на значительную глубину (сотни микрометров) и вызывает большие деформации. Поэтому в настоящей работе основное внимание уделено использованию УФ-излучения (3-я и 4-я гармоники, $\lambda = 355$ и 266 нм, соответственно), которые обеспечивают сравнительно эффективную абляцию и атомизацию материала.

Интенсивности спектров и отношение сигнал-шум при использовании 3-й и 4-й гармоник были близки. Для построения градуировочных зависимостей использовали 4-ю гармонику, так как она позволит добиться большего пространственного разрешения в возможных дальнейших исследованиях. В измерениях без образцов сравнения величина строба всегда составляла 10 % от величины задержки, чтобы можно было пренебречь изменением параметров плазмы за время регистрации спектра. В качестве критерия для выбора оптимальных временных параметров выступало отношение сигнал/шум

для линий Li I 670.78, Mg I 277.98 и Ca II 315.89 нм. Для линий Li I и Mg I зависимость имела монотонный характер, а для Ca II зависимость сигнал/шум в спектрах образцов БОк-2, IAEA-407 и ЛБ-1 от времени задержки имела хорошо выраженный максимум (Рисунок 2.11), причём для растительных материалов и обезжиренной ткани рыбы IAEA-407 максимум был смещён к более поздним временам, чем у животных образцов. Поэтому выбрали следующие задержки: 0.75 мкс для образцов тканей животных и 1.25 мкс для растительных и обезжиренных животных образцов.

Максимальное отношение сигнал/шум (Рисунок 2.12, а) для линии лития отмечалось при наблюдении плазмы в интервале задержек от 7.5 до ~ 30 мкс после лазерного импульса; соответственно, для регистрации спектров была выбрана задержка регистрации 7.5 и строб 20 мкс. Для ионных линий аналогичный эксперимент на примере линии стронция при 421.55 нм привёл к выбору задержки 1 мкс и строба 4 мкс, что согласуется с быстрым охлаждением плазмы и, как следствие, уменьшением степени ионизации содержащегося в ней вещества (Рисунок 2.12, б).

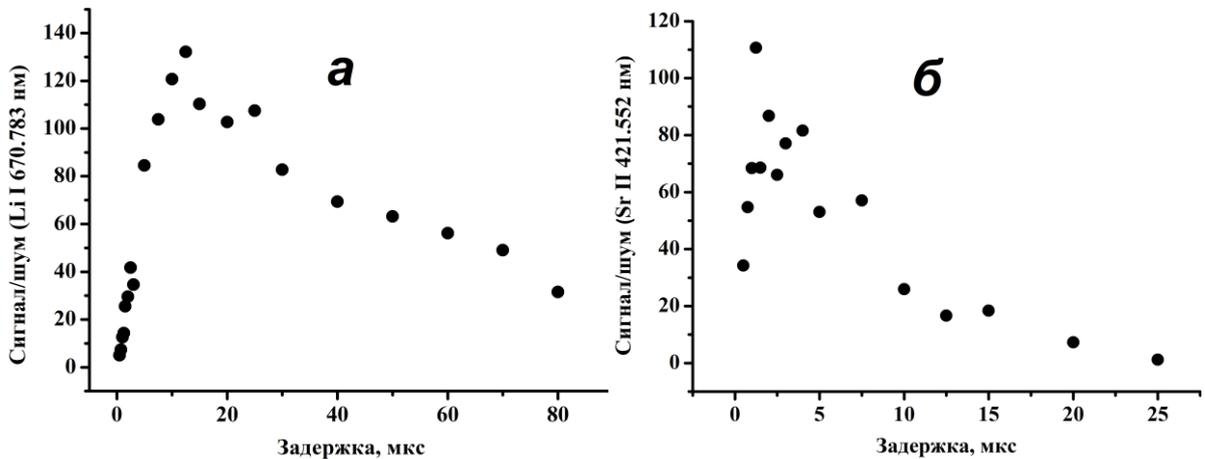


Рисунок 2.12. Зависимость соотношения сигнал/шум от задержки регистрации для линий: а) Li I 670.783 нм, б) Sr II при 421.552 нм; образец — ЛБ-1.

Энергию импульса и фокусировку тоже подбирали таким образом, чтобы соотношение сигнал/шум при прочих равных условиях было максимальным (для СО Тр-1, БОк-2 и IAEA-407 — на примере линии Li I 610.365 нм). Таким образом, эксперименты проводили при следующих условиях: энергия импульса 25 мДж, фокусировка в 5 мм под поверхностью образца, задержка 0.75 мкс для образцов тканей животных и 1.25 мкс для растительных и обезжиренных животных образцов.

2.8. Выбор аналитических линий с использованием моделирования спектров плазмы.

Результаты оценки T и N_e в ходе предварительных экспериментов дали ориентиры для термодинамического моделирования атомно-эмиссионных спектров стандартных образцов растений и животных тканей в широком спектральном интервале с целью выбора оптимальных аналитических линий элементов. Для количественного элементного

анализа в методе ЛИЭС наилучшими являются линии с минимальной степенью самопоглощения, минимальным уровнем спектральных помех и с максимальной интенсивностью. Экспериментальная оценка всех факторов является трудной и долго решаемой задачей, так как линии приходится выбирать из множества внесённых в базы данных линий в широком спектральном интервале. Для упрощения задачи мы использовали моделирование спектров с помощью алгоритма, разработанного ранее в нашей лаборатории [30,44].

Составление списка линий-кандидатов для анализа биологических образцов начали с моделирования спектра ГСО ЭК-1, т.к. этот образец содержит значительные количества неорганических компонентов и, следовательно, многие эмиссионные линии в его спектре могут быть подвержены самопоглощению. Если выбрать линии в спектре ЭК-1, для которых модель предсказывает низкий уровень самопоглощения и спектральных помех, но при этом достаточно высокую яркость, то в прочих образцах, где концентрации минеральных компонентов ниже, эти линии также можно будет использовать для количественного анализа (при условии, что они всё ещё будут достаточно яркими для надёжной регистрации сигнала).

Далее в полученный список внесли изменения с целью использовать спектральные диапазоны с наибольшей чувствительностью детектора и сократить их количество (всего 13 диапазонов). Учитывая большой диапазон содержаний лития в исследуемых образцах, в рассмотрение была добавлена линия Li I 610.37 нм, менее подверженная самопоглощению при высоких содержаниях лития, чем Li I 670.78. Мешающее влияние линии Ca I 610.27 во многих случаях поддаётся коррекции с использованием интенсивности линии Ca I 612.22 из того же мультиплета (из интенсивности линии Li вычитали интенсивность линии Ca I 612.22, умноженное на 0.3324 — соотношение величин gA для линий кальция). Этой процедуре способствовала близость энергий возбуждения переходов Li и Ca, а также тот факт, что зависимости степени ионизации от температуры для Li и Ca практически идентичны (так, при 10 000 К они составляют 95.99 и 96.21 %, соответственно). Полный список рассмотренных линий приведён в Приложении 2.

Для проведения количественного анализа биологических образцов методом ЛИЭС этот список был сокращён так, чтобы каждому элементу соответствовала одна-две аналитические линии. Кремний был исключён из рассмотрения из-за отсутствия для него данных независимого анализа в образцах зоопланктона. Помимо предварительного отбора линий, мы также проверяли соотношения интенсивностей компонентов в мультиплетах, тем самым исключая линии со значительным отклонением этого отношения от внутримультиплетного отношения вероятностей перехода (точнее, соответствующих членов gA , где g — вырождение уровня, A — вероятность).

Кроме того, важно проследить за выполнением необходимого критерия существования локального термодинамического равновесия в плазме — критерия Мак-Виртера — Хея (см. уравнение 8). В Таблице 2.5 приведены пороговые значения плотности электронов N_e для некоторых использованных нами переходов. Значение критерия в большой степени зависит от поведения фактора Гаунта [27] (Рисунок 2.13). Для ионных переходов даже с большой энергией критическая N_e не очень велика по сравнению с её типичными значениями в ЛИЭС (от 10^{16} до $5 \times 10^{17} \text{ см}^{-3}$ [30]), поэтому для ЛИЭС БОС можно использовать ионные линии, лежащие во всём оптическом диапазоне. Наоборот, переходы нейтральных атомов, лежащие в УФ-диапазоне, могут выпадать из ЛТР даже при N_e выше 10^{17} см^{-3} . Соответственно, в ЛИЭС БОС приходится отказываться от использования некоторых аналитических линий для тех образцов, где N_e недостаточно высока.

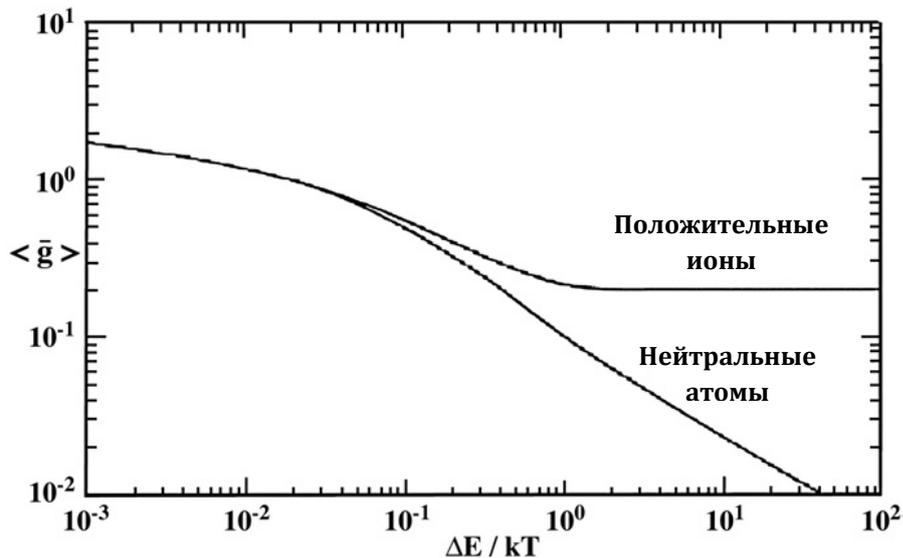


Рисунок 2.13. Фактор Гаунта для нейтральных атомов и ионов в зависимости от $\Delta E/kT$ (воспроизведено из работы [27]).

Таблица 2.5. Критические значения N_e по Мак-Виртеру — Хею для переходов с наибольшими ΔE .

Переход (λ в нм)	Критическая N_e , 10^{16} см^{-3}		
	при $kT = 1 \text{ эВ}$	при $kT = 0.7 \text{ эВ}$	при $kT = 0.4 \text{ эВ}$
P I 213.62	17	18	17
C I 247.86	9.9	10	11
Mg I 277.98	6.3	6.9	7.3
Na I 330.26	3.5	3.5	3.8
Ca II 211.28	2.8	2.3	1.9
Mg II 279.08	1.2	1.0	0.79
Mg I 517.27	0.65	0.69	0.73

В Таблице 2.6 приведён окончательный список аналитических линий с их характеристиками. Важно отметить, что указанные в таблице расчётные коэффициенты пропускания рассчитываются на центральных длинах волн соответствующих переходов.

На «крыльях» контуров спектральных линий самопоглощение значительно меньше. Поэтому, по сравнению с пиковой интенсивностью, интегральная интенсивность линий менее чувствительна к самопоглощению, поэтому она и использовалась в работе при проведении количественных измерений. Знаком (*) отмечены линии, использовавшиеся для построения градуировочных зависимостей. Если для одного элемента использовались две линии или более, тогда для расчёта окончательного результата использовали линию, обеспечивавшую лучшую правильность и воспроизводимость.

Таблица 2.6. Список аналитических эмиссионных линий.

Переход (λ , нм)	E_i , эВ	E_k , эВ	Расч. пропускание (мин.)		Расч. пропускание (макс.)	
			Знач.	Прим.	Знач.	Прим.
V I 249.77*	0.0000	4.9643	0.832	ЛБ-1	0.993	№ 5225
Ca I 429.90*	1.8858	4.7690	0.445	ЭК-1	0.984	№ 5
K I 404.41*	0.0000	3.0649	0.990		0.996	
Li I 610.37	1.8479	3.8786	0.989	АТ-71	0.997	Тр-1
Li I 670.78	0.0000	1.8479	0.643		0.994	
Mg I 383.23*	2.7116	5.9459	0.962	АТ-71	0.967	№ 5225
Mg I 517.27*	2.7116	5.1078	0.964		0.968	
Mg II 279.08	4.4224	8.8638	0.744	ЛБ-1	0.904	Тр-1
Na I 330.30*	0.0000	3.7526	0.425	Седов	0.945	
P I 253.56*	2.3245	7.2127	0.207	Седов	0.818	ЛБ-1
P I 255.33	2.3213	7.1758	0.460		0.935	
Sr I 460.73	2.6902	5.6949	0.622	Седов	0.997	№ 5225
Sr II 407.77*	0.0000	3.0397	0.587		0.988	БОк-2
Sr II 421.55	0.0000	2.9403	0.747		0.994	
C I 247.86	2.6840	7.6848	0.063	ЛБ-1	0.209	ЭК-1

“Расч. пропускание” = пропускание, предсказанное с помощью моделирования. В столбцах “Примечание” указано, в каких образцах получены минимальные и максимальные значения пропускания для каждого элемента (как правило, это были образцы с наибольшим и наименьшим содержанием этого элемента, соответственно).

2.9. Определение состава методом ЛИЭС без образцов сравнения

Возможность реализации условий ЛТР в лазерно-индуцированной плазме проверяли по критерию Мак-Виртера–Хея (уравнение 8). Для нейтральных атомов и однозарядных положительных ионов ван Регемортером была предложено [282] приближение для оценки усреднённого фактора Гаунта в виде функции от безразмерного соотношения $\Delta E/kT$ (Рисунок 2.13). Эти результаты были использованы в наших расчётах.

Для биологических образцов удобно использовать упрощённый вариант ЛИЭС БОС, заключающийся в расчёте соотношений массовых долей элементов (вместо самих массовых долей) в предположении отсутствия фракционирования при лазерной абляции [137]. С учётом ионизации элемента уравнение для интенсивности эмиссионной линии (12) можно записать следующим образом:

$$I = \alpha\Phi \left(\frac{hc g_k AN}{4\pi\lambda Z(T)} \right) \exp\left(\frac{-E_k}{kT} \right). \quad (33)$$

Здесь α — доля концентрации рассматриваемой частицы по отношению ко всем остальным формам данного химического элемента в плазме, которую можно рассчитать по уравнению Саха–Эггера (2). Например, для кальция можно записать:

$$\alpha_{\text{Ca I}} = \frac{n(\text{Ca I})}{n(\text{Ca I}) + n(\text{Ca II}) + \dots} \quad (34)$$

Тогда массовое соотношение элементов X и Y с атомными массами μ_X и μ_Y можно выразить следующим образом:

$$f = \frac{M_X}{M_Y} = \frac{\mu_X I_{\lambda(X)} Z_X (gA)_Y \exp\left(-\frac{E_Y}{kT}\right) \alpha_Y \lambda(X)}{\mu_Y I_{\lambda(Y)} Z_Y (gA)_X \exp\left(-\frac{E_X}{kT}\right) \alpha_X \lambda(Y)}, \quad (35)$$

где M — абсолютная масса соответствующего элемента или его массовая доля в мишени [136].

2.10. Предварительная обработка спектральных данных.

Предварительную обработку эмиссионных спектров начинали с удаления выбросов по критерию Граббса, последовательно применяя его к пиковым интенсивностям линий Li I при 610.3 нм, C I при 247.8 нм, Na I при 568.3 нм, Ca II при 396.8 нм и головы молекулярной полосы C_2 при 473.6 нм. После удаления выбросов спектры для каждого образца усредняли.

После удаления остаточного сигнала флуоресценции (Рисунок 2.14) с помощью созданной автором программы (см. раздел 2.5.2) спектры КР нормировали на суммарную интенсивность, чтобы компенсировать различия в условиях регистрации от образца

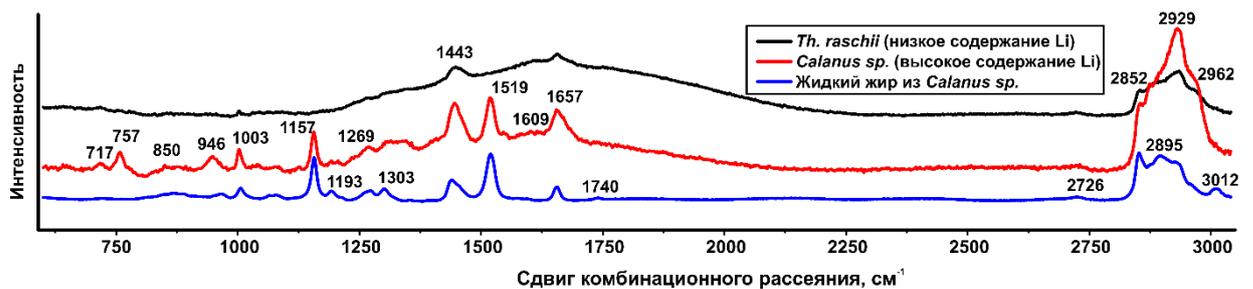


Рисунок 2.14. Спектры КР ракообразных (*Thysanoessa raschii* [№ 12] и *Calanus hyperboreus* [№ 16]) до вычитания фона.

к образцу (неодинаковая ширина щели и мощность возбуждающего лазерного излучения), и усредняли. Спектры, относящиеся к материалу разных цветов, последовательно объединяли друг с другом (тёмный – промежуточный – светлый). Когда было необходимо получить набор данных, содержащий одновременно и эмиссионные спектры, и спектры КР, блоки данных делили на их евклидовы (фробениусовы) нормы и объединяли друг с другом (блок ЛИЭС – блок СКР), получая, например, матрицу размера 29×45228 .

Для анализа данных мы использовали несколько алгоритмов разложения матриц и объединения данных. Эти операции проводили в программах Origin 8.5, GNU Octave, Microsoft Excel, Wolfram Mathematica 8 и Matlab 2020.

Отправной точкой для изучения структуры данных служило их разложение методом главных компонент (см. раздел 1.5). Для его осуществления мы пользовались функцией *pca* из пакета *statistics* для среды GNU Octave 8. Количество значимых главных компонент (ГК) определяли по положению излома на графике зависимости собственных значений ГК от её номера. То же количество ГК предполагалось и в неотрицательном разложении тех же исходных матриц (метод НМР). Чтобы избежать возможного неблагоприятного влияния начального приближения на результаты разложения методом НМР, мы повторяли разложение 100 раз и считали конечным результатом ту комбинацию матриц W и H , которая характеризовалась наибольшей объяснённой дисперсией. НМР осуществляли с помощью функции *nmf_bpas* из пакета *linear-algebra* для среды GNU Octave.

Консенсусный МГК проводили в среде Matlab с помощью пакета MBToolbox, разработанного Франсом ван ден Бергом⁴. Метод анализа независимых компонент (АНК) в настоящей работе был представлен исключительно как часть алгоритма ComDim для анализа многоблоковых данных, Matlab-код которого был любезно предоставлен нам профессором Д. Рутледжем (Национальный музей естественной истории, Франция). Этот вариант ComDim мы далее будем обозначать как ComDim–АНК. В данном случае АНК был реализован на основе совместной приближённой диагонализации собственных матриц (Joint Approximated Diagonalisation of Eigen matrices, JADE). Также использовали вариант ComDim, где общие компоненты рассчитываются методом МГК (ComDim–МГК).

Во многих случаях мы исключали из рассмотрения ряд спектральных диапазонов. Как правило, они содержали очень интенсивные (в основном резонансные) линии, подверженные самопоглощению в лазерной плазме. Эти сигналы, интенсивность которых нелинейно зависит от концентрации, искажали результаты разложений. Список исключённых диапазонов приведён в Таблице 2.7. Кроме того, из спектров КР удаляли неинформативный диапазон с волновыми числами более 1921 см^{-1} .

⁴ См. <https://ucphchemometrics.com/186-2/algorithms/>.

Таблица 2.7. Список спектральных диапазонов, исключённых из эмиссионных спектров.

Диапазон		Описание (λ в нм)
Начало (λ , нм)	Конец (λ , нм)	
247.27	248.16	C I 247.856
278.57	285.71	Переходы Mg II $^2D \rightarrow ^2P^o$ и $^2P^o \rightarrow ^2S$ Mg I 285.213
392.35	394.00	Ca II 393.366
396.46	397.63	Ca II 396.847
421.9	423.23	Ca I 422.673
583.71	595.00	Na I 588.995 Na I 589.592
762.35	772.61	K I 766.490 K I 769.896
817.16	820.77	Na I 818.326 Na I 819.479 Na I 819.482
> 947.793		Неинформативный диапазон

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Элементный анализ биологических материалов методом ЛИЭС⁵

3.1.1. Обсуждение эволюции плазмы различных биологических материалов

В настоящей работе аналитические измерения проводили как с использованием обычных градуировочных зависимостей, так и только на основании спектральных данных без образцов сравнения (ЛИЭС БОС). Интерес к ЛИЭС БОС обусловлен крайне ограниченной доступностью образцов сравнения для биологических тканей.

Основными компонентами биологических тканей являются углерод (на него приходится около 50 % сухой массы [283]), водород (около 50 ат. %) и другие неметаллы (O, N, P, S, Cl). Отметим, что из-за высокой энергии ионизации неметаллов, электронная плотность в лазерно-индуцированной плазме при испарении биологических тканей будет во многом зависеть от содержания неосновных легкоионизируемых элементов, таких как K, Na, Ca и других.

Как было показано в обзоре литературы, для диагностики лазерно-индуцированной плазмы биологических материалов хорошо подходят линии кальция и магния (Таблица 2.4) как элементов, присутствующих в большинстве проб и имеющих достаточно богатый спектр. Недостатки использования линий кальция — невысокая точность, с которой определены вероятности переходов для его линий (согласно оценкам, приведённым в базе NIST [47], погрешность вероятностей переходов Ca I-II в оптическом диапазоне колеблется в пределах 18–50 %), а также необходимость работать в нескольких спектральных диапазонах для регистрации необходимых для диагностики линий. Необходимо также учитывать, что некоторые спектральные диапазоны, которые могли бы

⁵ При подготовке настоящего раздела диссертации использованы публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении учёных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Н.И. Сушков, Н.В. Лобус, И.В. Селиверстова, Т.А. Лабутин. Химический анализ зоопланктона методом лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии без использования образцов сравнения // Оптика и спектроскопия. 2020. Т. 128, вып. 9. С. 1231. – 0.81 п.л. Вклад автора 70 %. ИФ (РИНЦ) – 0.84.

Nikolai I. Sushkov, Timur A. Labutin. Laser-induced breakdown spectroscopy of biological tissues: Plasma diagnostics and a comparison of quantification approaches // Spectrochim. Acta B. 2024. V. 211. No. 106834. – 1.09 п.л. Вклад автора 70 %. ИФ (Web of Science, JIF) – 3.4.

Н.И. Сушков, Н.Н. Курьян, С.Н. Анучин, С.М. Зайцев. Совместное применение лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии и рентгенофлуоресцентной спектроскопии для элементного анализа водных организмов // Журнал прикладной спектроскопии. 2023. Т. 90, № 6. С. 917. – 1.04 п.л. Вклад автора 80 %. ИФ (РИНЦ) – 0.47.

быть удобны для диагностики плазмы, становятся непригодными из-за излучения молекул.

Альтернативой атомным линиям именно для диагностики плазмы при испарении биологических тканей является излучение молекул (в первую очередь CN, C₂). Так как сложная вращательная структура молекулярных полос в экспериментах по ЛИЭС, как правило, не разрешена, для получения надёжной оценки температуры предложено использовать интегральную интенсивность колебательных полос с хорошим соотношением сигнал/шум для его аппроксимации модельными данными (подробнее см. раздел 1.2.3). Расчёт по данным ИВТАНТЕРМО [284] показывает, что константа равновесия реакции $C+N \leftrightarrow CN$ довольно слабо зависит от температуры (5.0×10^{-7} при 3000 К и 2.5×10^{-7} при 12200 К), так что присутствие CN в плазме можно ожидать на различных этапах её существования.

Для подбора оптимальных условий эксперимента мы изучили не только состояние плазмы в фиксированный момент времени, но и проследили эволюцию параметров плазмы при испарении животных тканей, полученной с использованием 3-й и 4-й гармоники лазера (Рисунок 3.1), в интервале задержек 0.5–3 мкс после лазерного импульса с энергией 24 мДж [136].

Исходя из скорости рекомбинации частиц в плазме и динамики снижения её температуры (Рисунок 3.1), критерий Мак-Виртера — Хея выполняется для выбранных аналитических линий (см. Таблицу 2.5, с. 79) только в начальные периоды существования плазмы. В частности, для линии Na I при 330 нм значение критерия в интервале 11500–4000 К составляет около $4 \times 10^{16} \text{ см}^{-3}$, а это означает, что данный переход может находиться в состоянии ЛТР не далее 1.5 мкс после лазерного импульса (для 3-й гармоники лазера).

Для 4-й гармоники лазера температура плазмы несколько ниже, однако на средних временах жизни плазмы (750–1500 нс) разница очень невелика. Различие в электронных плотностях составляет 5.1 раза в зависимости от задержки. В целом можно говорить о сходстве временного развития плазмы, возбуждённой импульсами 3-й и 4-й гармоник Nd:АИГ-лазера, а диапазон охватываемых значений температуры и электронной плотности при использовании 4-й гармоники шире. Помимо этого, с 4-й гармоникой можно добиться большего пространственного разрешения при необходимости проведения подобных измерений. С учётом того, что использование 4-й гармоники позволяет достигнуть лучшей правильности (подробнее см. раздел 3.1.3), дальнейшие измерения были проведены только с использованием 4-й гармоники ($\lambda = 266 \text{ нм}$).

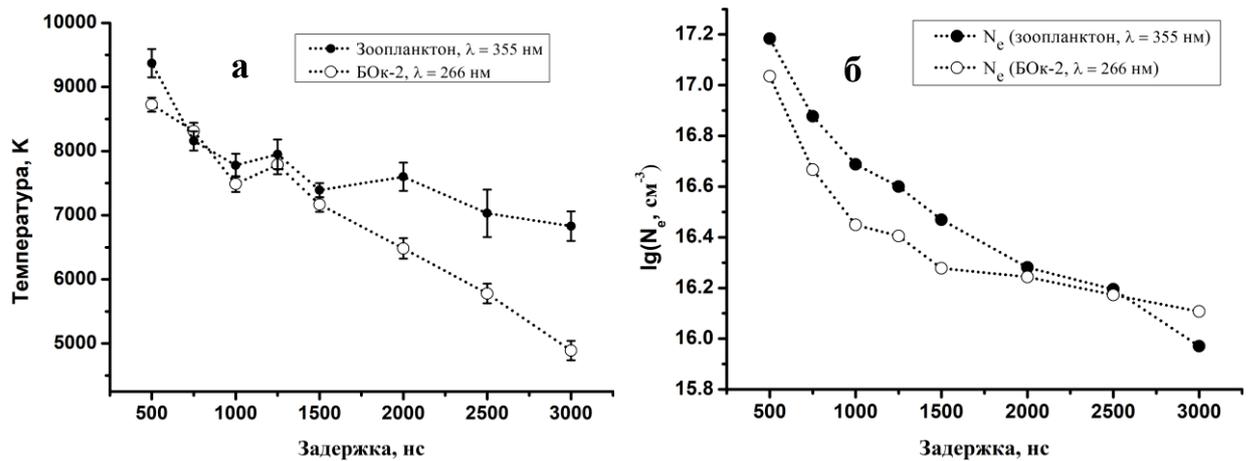


Рис. 3.1. Временное развитие плазмы ГСО БОК-2, а: сравнение температур в экспериментах с 3-й и 4-й гармониками (аппроксимация контура CN); б: сравнение электронных плотностей.

Рисунок 3.2 даёт представление о временной эволюции T и электронной плотности в плазме животных и растительных образцов (БОК-2 и ЛБ-1, соответственно). Здесь строб всегда составлял 10 % соответствующей задержки. На рисунке видно, что условия на ранних временах (задержка 500 нс) практически одинаковы для обоих образцов; раз-

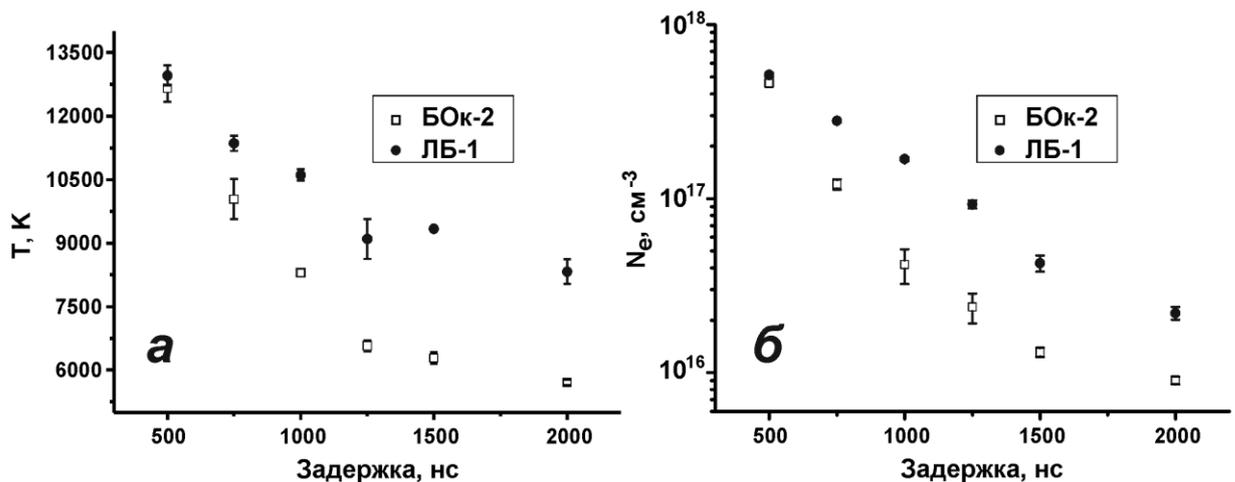


Рисунок 3.2. Временная эволюция температуры (а) и электронной плотности (б) в животных (БОК-2) и растительных (ЛБ-1) образцах.

витие плазмы протекает схожим образом, но плазма БОК-2, по-видимому, охлаждается значительно быстрее, чем плазма ЛБ-1, — возможно, из-за различий в минеральном составе.

В Таблице 3.1 для СО растительных и животных тканей и четырёх образцов зоопланктона — Седов, АТ-71, № 5 и № 5225 (см. Таблицу 2.2) — приведены результаты диагностики плазмы при оптимальных задержках, для которых наблюдается максимальное соотношение сигнал-шум: 750 нс для животных образцов и 1250 нс — для растительных. Образец IAEA-407, который представляет собой обезжиренную мышечную ткань сельди, вёл себя подобно растительным материалам, поэтому его анализировали в тех же условиях, что и растения. Температура внутри двух групп материалов близки,

явной корреляции между параметрами плазмы и элементным составом образцов не наблюдается.

Таблица 3.1. Температуры и плотности электронов, рассчитанные на основе пространственно-интегрированных сигналов.

Образец	Задержка, мкс	$T_{\text{возб.}}, \text{K}$	$N_e, 10^{16} \text{ см}^{-3}$
ЭК-1	1.25	8780±480	5.8±2,0
ЛБ-1		9100±470	7.7±1,4
Тр-1		8910±410	*
IAEA-407		8840±360	9.2±2,9
БОК-2	0.75	10040±480	12±4
Седов		11500±500	28.3±0.6
№ 5225		11690±420	**
№ 5		10810±410	**
АТ-71		10870±580	22±3

*Считается такой же, как и в ЛБ-1.

**Считается такой же, как в АТ-71.

3.1.2. Рассмотрение данных с разбиением плазмы на зоны по высоте.

Кроме спектров пространственно-интегрированного излучения лазерной плазмы, мы исследовали и распределение сигналов по высоте плазмы, чтобы добиться её более точной характеристики по температуре и электронной плотности. *Вертикальные профили* (см. раздел 2.5.4) общей светимости плазмы представлены на Рисунке 3.3, а.

Для сравнения различных профилей удобно ввести меру их ширины. Для простоты положение максимальной интенсивности профиля считали его *центром*, а пиксели, где интенсивность достигала половины максимального значения, определяли как границы («низ» и «верх»). Таким образом, полная ширина на половине высоты (**ПШПВ**) профиля была равна разнице между точками «верх» и «низ». Однако мы считали ширину профиля равной $2 \times \text{ПШПВ}$, так что нижний край плазмы приходился на координату $\text{центр} - 2(\text{центр} - \text{низ})$, а верхний край — на $\text{центр} + 2(\text{верх} - \text{центр})$. Для профилей суммарного излучения плазмы, рассчитанных из суперпозиции изображений, полученных в тринадцати спектральных диапазонах, предполагали ширину $3 \times \text{ПШПВ}$.

Основная часть излучения как ионов, так и атомов исходит из центрального горячего ядра плазмы (Рисунок 3.3). Это справедливо для эмиссионных линий как с высокими (Mg I 277.98 нм, линии неметаллов и т. д.), так и с низкими энергиями верхних уровней, и даже для молекул. Легковозбуждаемые переходы (такие как резонансная линия Li I и полосы CN) наблюдаются в широком диапазоне вертикальных координат. Однако есть определённые исключения, которые, по-видимому, связаны с особенностями испарения и атомизации материала, а также эволюции плазмы. Излучение водорода тяготеет к нижней части плазмы, которая ближе к поверхности мишени. Это можно объяснить притоком водорода из окружающего воздуха (ср. [285]) в количествах, сравнимых с массой водорода, попадающего в плазму из материала мишени.

Для проведения количественных измерений мы также рассматривали три зоны (см. Рисунок 2.6), каждая из которых характеризуется своей температурой $T(x)$ и плотностью электронов. Здесь x — номер зоны в плазме. Значения температуры $T(x)$ и электронной плотности для каждой зоны приведены в Таблице 3.2. Соотношения элементов (например, Ca/C) можно рассчитать как во всей плазме ($\sum_x N_{Ca}(x)/\sum_x N_C(x)$), так и в отдельно взятых зонах.

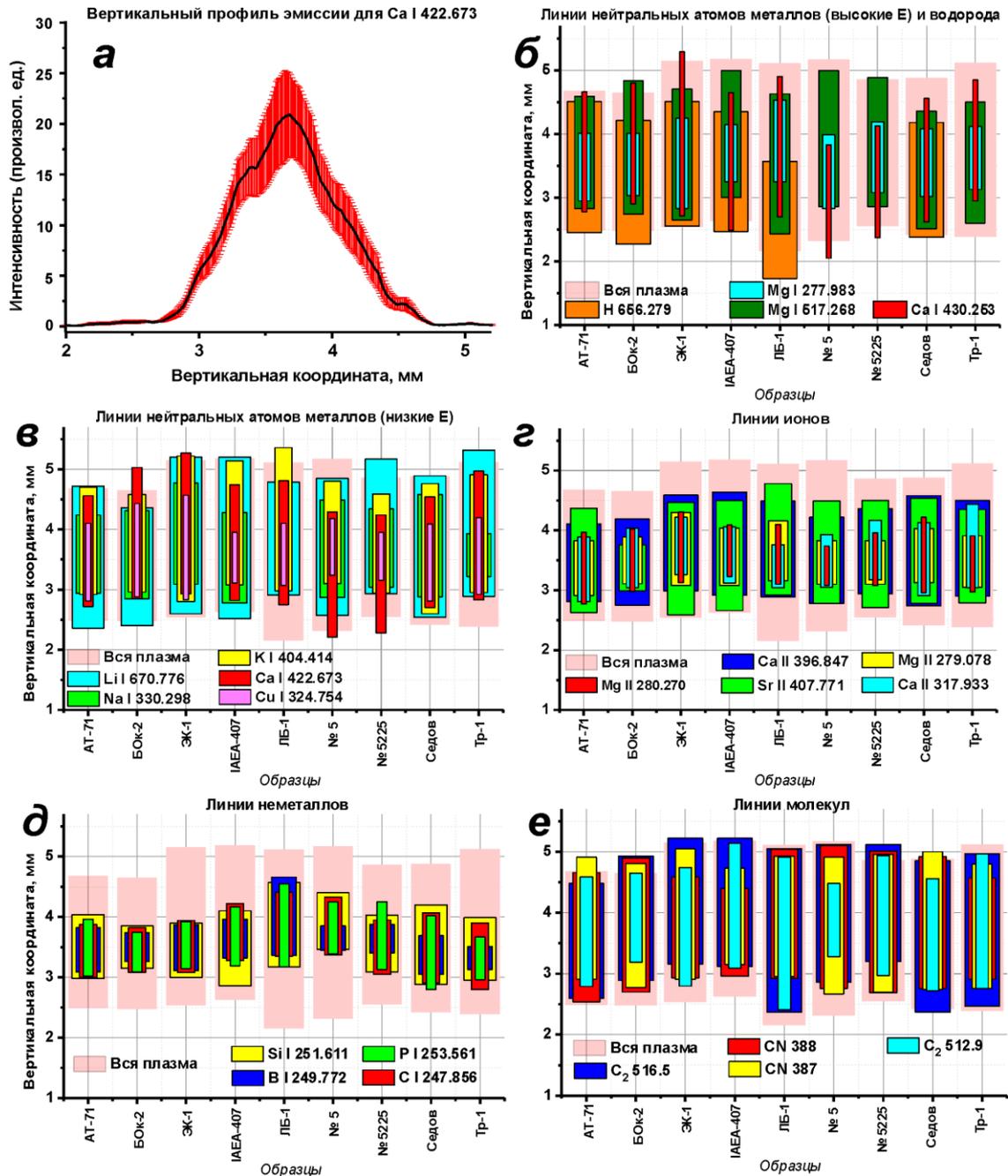


Рис. 3.3, а: вертикальный профиль интенсивности излучения линии Ca I при 422.67 нм в зоопланктоне из зал. Седова. Чёрная линия обозначает средние значения, а красными штрихами показана стандартная ошибка среднего значения в каждой точке; б–е: область эмиссии линий водорода и нейтральных металлов с высокой энергией верхнего уровня (б), линий нейтральных металлов с низкой энергией верхнего уровня (в), ионных линий (г), линий неметаллов (д) и молекул (е).

Таблица 3.2.
Параметры плазмы по зонам (Т в К, N_e в единицах 10^{16} см^{-3}).
 Δ = стандартная ошибка среднего.

Обра- зец/зона	Зона I			Зона II			Зона III		
	Т, К	ΔT	N_e	Т, К	$\Delta T, \text{ К}$	N_e	Т, К	$\Delta T, \text{ К}$	N_e
АТ-71	11500	420		10400	310		7180	160	
№ 5	8900	220	19.5	10050	120	16.6	8660	30	6.6
№ 5525	8700	80		10900	250		9220	–	
Седов	10170	80	27.9	11700	330	23.7	10130	20	25.2
Бок-2	10400	580	21.3	10400	230	19.1	7400	310	19.1
ИАЕА-407	7700	140	7.3	8900	130	7.7	7180	30	7.0
ЛБ-1	7820	80	9.4	10060	130	7.6	7500	510	7.6
Тр-1	7800	300		7460	160		6650	50	
ЭК-1	7300	450	6.3	8920	130	5.9	6350	130	2.0

Для бóльшей части образцов температура достигает максимума в средней зоне плазмы, но для Тр-1, Бок-2 и АТ-71 зона I (ближайшая к мишени) имеет такую же или более высокую температуру. Электронная плотность почти везде убывает по мере удаления от мишени. Таким образом, несмотря на фиксированные временные параметры регистрации спектров, наблюдаются особенности развития плазмы для разных образцов.

3.1.3. Сравнение различных способов определения элементного состава биоматериалов методом ЛИЭС с использованием множителя правильности.

Одной из задач настоящей работы было количественное определение ряда элементов в зоопланктоне. Так как стандартных образцов состава животных тканей существует очень мало, мы рассмотрели использование ЛИЭС БОС в добавление к традиционным градуировочным зависимостям. Использование ЛИЭС БОС в данном случае позволяет избежать влияния матричных эффектов, характерных для всех прямых аналитических методов при построении градуировочных зависимостей.

Из-за особенностей основы пробы количество доступных линий ограничено. Например, для лития, бора и углерода наблюдались лишь линии Li I 610.37, Li I 670.78, В I 249.67, В I 249.77 и С I 247.85 нм. Полный список рассмотренных линий приведён в Приложении 2, а список линий, выбранных для аналитических измерений, приведён в Таблице 2.6.

Для облегчения восприятия количественных результатов мы нормировали результаты определения методом ЛИЭС на паспортные значения или на содержания по данным ИСП–АЭС: $c' = c/c_{\text{опор}}$, где c и $c_{\text{опор}}$ — измеренные и опорные значения, соответственно. Тогда в идеальном случае все значения c' будут равны единице. Для

оценки качества результатов по всем рассмотренным образцам можно использовать различные метрики, например, среднеквадратическую ошибку:

$$\text{СКО} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (c' - 1)^2}. \quad (36)$$

В работе [286] мы также предложили новую метрику — т.н. множитель правильности, МП (accuracy factor, AF). Она рассчитывается следующим образом: значения $c' < 1$ заменяются на $1/c'$, так что теперь все величины показывают степень отклонения конкретного результата от опорного значения. В случае широкого распределения результатов измерений, что характерно для лазерной абляции, формальная проверка на выбросы часто оказывается неэффективной. Чтобы снизить чувствительность формулы к крайним значениям, мы предложили отбрасывать результаты за пределами квантиля уровня 90 % ($r_{0.9}$) для рассматриваемой выборки. Это аналогично применению стандартизированной оценки z для оценки приемлемости результатов измерений (ср. определение неприемлемого результата в ГОСТ ISO 13528-2024 [287]). После прибавления единицы получается показатель мультипликативной природы: $\text{МП} = 1 + \sqrt{\frac{1}{n} \sum (r - 1)^2}$, где $r = \begin{cases} 1/c', & c' < 1 \\ c', & c' \geq 1 \end{cases}$, $r < r_{0.9}$, а n — число образцов (для данного химического элемента) или элементов (для данного образца). Например, МП, равный 1.5, означает, что результаты совпадают с опорным значением с точностью до множителя 1.5 (т.е. значения c' лежат примерно между 0.67 и 1.5). Результаты, отбрасываемые при расчёте МП, не являются величинами, искажёнными под действием постороннего фактора (например, попаданием луча испаряющего лазера мимо образца), а появляются в силу особенностей образца и динамики абляции.

При отсутствии систематической погрешности МП близок к $\text{СКО} + 1$. Напротив, для таких выборок, как, например, $\{0.08, 0.21, 0.18, 1.05\}$, МП (4.4) далёк от $\text{СКО} + 1$ (1.7) и, таким образом, нагляднее показывает размах отклонений и указывает на возможную систематическую погрешность. Для приведённой выборки погрешность велика, и это отражается в значении МП, указывающем на более чем 4-кратные различия. В то время как СКО — показатель аддитивной природы (как и доверительный интервал и подобные величины), МП имеет мультипликативную природу и умеренную чувствительность к выбросам по сравнению с СКО. Для вектора $\{1.01, 0.99, 1.01, 0.99, 1.01, 0.99\}$ СКО равно 0.02, а МП — 1.01. Но если заменить первый член списка значением 0.10, СКО станет равно 0.45, а МП останется равным 1.01, так как 0.10 при расчёте МП не учитывается.

Можно переформулировать определение МП следующим образом: МП показывает, какое наиболее вероятное значение r можно ожидать от данной методики. Метрики, подобные МП, необходимы в силу специфики ЛИЭС БОС, которая, по крайней мере в своём стандартном варианте, предусматривает определение всех элементов пробы (при этом одновременно в совершенно разных диапазонах концентраций) и потому нуждается в интегральной метрике, описывающей весь анализ (по всем элементам и всем образцам), в то время как стандартные общепаналитические показатели (такие как стандартная ошибка, смещение и среднеквадратичная ошибка), хорошо применяются к одному отдельно взятому определяемому показателю (концентрации элемента).

В настоящей работе мы воспользовались упрощённым алгоритмом ЛИЭС БОС, который даёт соотношения концентраций элементов вместо их массовых процентов (см. уравнение 35, стр. 81). Этот подход оправдан при анализе высушенных биологических образцов, макроэлементный состав которых довольно постоянен. Осуществление полного алгоритма, подразумевающего определение всех элементов образца, в данном случае становится затруднительным, так как тогда приходится иметь дело с сигналами атмосферных газов: водорода, кислорода и азота, что исключает измерения на воздухе. Кроме того, переходы этих элементов имеют высокие потенциалы возбуждения (например, для линий O I — не менее 10.74 эВ для разрешённых в дипольном приближении переходов [47]) и поэтому с большой долей вероятности в условиях, пригодных для аналитических измерений, они не будут находиться в состоянии ЛТР с другими переходами.

Таблица 3.3.
Результаты анализа зоопланктона АТ-71 методом ЛИЭС
с использованием различных гармоник лазера на АИГ:Nd³⁺.
 (соотношения Э/Мg после нормировки
 на результаты ИСП–АЭС: 1 = идеальное совпадение).

Элемент	$\lambda = 355$ нм	$\lambda = 266$ нм
Li	0.50	0.92
Na	0.11	0.22
K	0.17	0.77
Ca*	0.89	1.05
МП	3.82	1.18
СКО	0.66	0.41

*По линии Ca I при 612.22 нм.

Задержка регистрации 750 нс, строб 80 нс.

Температура плазмы оценена по спектру CN. Для вычисления соотношений использовали линию Mg I при 517.27 нм.

Более целесообразно ограничиться определением соотношений между концентрациями элементов.

Соотношения часто фигурируют в прикладных исследованиях (Sr/Ca в климатологии [288], Fe/Mn и Fe/Si в геологии [138,289] и т. д.). Если определены соотношения всех элемен-

тов, входящих в образец, можно перейти к их массовым концентрациям. Поскольку предварительные оценки указывали на близкие показатели по интенсивности спектров и отношению сигнал-шум при использовании 3-й и 4-й гармоник, для образца

зоопланктона АТ-71 были определены соотношения элемент/магний для Li, Na, K и Ca при испарении пробы обеими гармониками (Таблица 3.3). Из таблицы видно, что 4-я гармоника ($\lambda = 266$ нм) даёт преимущество в правильности при определении валового

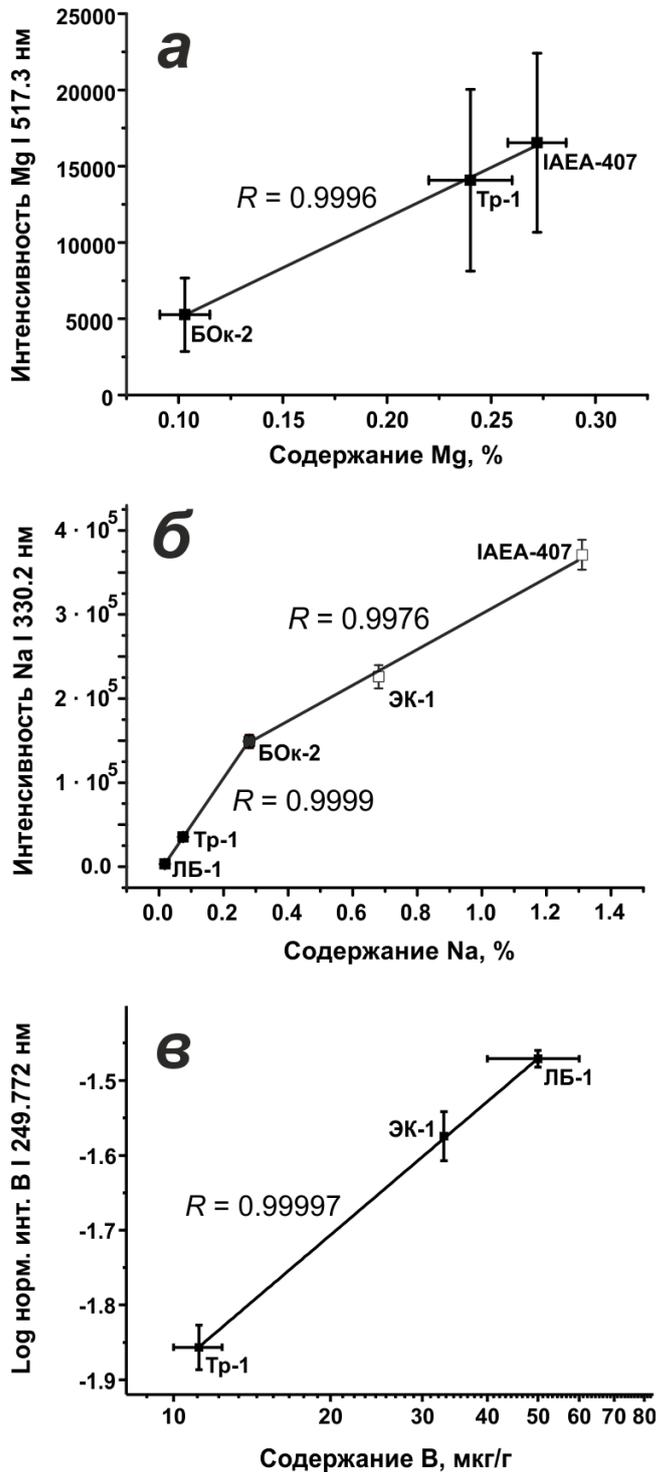


Рис. 3.4. Градуировочные графики для определения магния (а, Mg I 517.27 нм), натрия (б, Na I 330.24 нм) и бора (в, В I 249.77 нм).

содержания элементов (помимо потенциально лучшего пространственного разрешения при локальном анализе). Поэтому ниже мы будем обсуждать результаты, полученные только с её использованием.

В рамках изучения элементного состава биологических образцов мы получили три набора данных:

- 1) результаты, полученные методом градуировочного графика (сокращённо — набор «Град»);
- 2) результаты ЛИЭС БОС по пространственно-интегрированным сигналам («БОС1»);
- 3) результаты ЛИЭС БОС с учётом температуры и электронной плотности в каждой зоне плазмы («БОС2»).

Для построения градуировочных зависимостей использовали СО биологических тканей БОк-2, IAEA-407, ЭК-1, ЛБ-1 и Тр-1 (см. Таблицу 2.2). Примеры показаны на Рисунке 3.4. При определении В, Са, К и Sr использовали углерод в качестве внутреннего стандарта для снижения влияния матричных эффектов [92]. Сигналом сравнения выступала интенсивность линии С I 247.856 нм. В некоторых случаях (В, Са, К) использовали биогарифмические координаты.

Таблица 3.4.

Результаты элементного анализа биологических образцов методом ЛИЭС (после нормировки на результаты ИСП–АЭС или аттестованные содержания: 1 = идеальное совпадение).
«Град»: ЛИЭС с градуировкой. **Б1:** ЛИЭС БОС на пространственно-интегрированных сигналах.
Б2: ЛИЭС БОС с разбиением плазмы на зоны по высоте.

Элемент	Жирные образцы, расчёт по соотношению Э/С														Нежирные образцы, расчёт по соотношению Э/Mg**							
	АТ-71			№ 5			№ 5225			Седов			БОк-2*		IAEA-407*		ЛБ-1*		Тр-1*		ЭК-1*	
	Град	Б1	Б2	Град	Б1	Б2	Град	Б1	Б2	Град	Б1	Б2	Б1	Б2	Б1	Б2	Б1	Б2	Б1	Б2	Б1	Б2
В	0.82	1.38	2.10	н/д	н/д	н/д	0.68	н/д	н/д	0.19	1.67	2.60	н/д	н/д	н/к	н/д	3.00	4.89	6.14	2.24	4.62	2.82
Са	1.02	0.50	1.49	0.94	1.59	0.75	0.97	2.55	н/д	1.38	1.09	0.77	0.60	1.35	0.58	0.65	1.09	1.49	1.91	1.46	0.99	1.05
К	1.07	0.98	1.68	1.39	2.68	2.54	0.48	3.90	2.16	0.87	2.27	3.33	1.94	1.99	н/д	н/д	4.11	н/д	3.43	2.72	3.26	3.75
Li	–	1.00	1.16	–	0.43	0.23	–	2.82	1.36	1.6†	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д	н/д
Mg***	1.73	0.72	1.28	н/д	0.42	0.33	н/д	2.37	1.20	0.92	1.18	1.03	1.44	1.66	0.80	0.78	0.75	1.18	0.79	1.13	0.91	1.29
Na	0.08	0.25	0.42	0.21	0.54	0.48	0.18	2.79	2.12	1.05	1.40	1.14	11.0	1.24	1.64	1.90	3.95	н/д	2.87	2.19	1.90	1.93
P	0.85	0.68	1.03	1.12	1.07	1.03	0.95	2.62	1.94	2.51	1.82	1.36	1.70	0.99	1.34	1.91	2.48	5.64	2.73	3.91	4.69	4.70
Sr	0.34	0.10	0.29	н/д	0.71	0.77	н/д	1.25	0.74	0.99	0.92	0.66	0.37	1.94	0.52	0.64	1.07	2.30	0.96	2.31	0.37	0.56
МП	1.9	2.2	1.7	1.2	1.9	2.2	1.6	2.5	1.7	1.6	1.5	1.7	2.0	1.5	1.5	1.6	2.6	3.1	2.5	2.1	2.9	2.4
СКО	0.52	0.49	0.60	0.45	0.77	0.74	0.46	1.8	0.79	0.67	0.64	1.1	4.1	0.64	0.44	0.62	1.9	2.8	2.4	1.5	2.2	1.9

Н/д = Ниже предела обнаружения или относительная стандартная ошибка среднего значения сигнала превышает 1.

Н/к = Не аттестовано в стандартном образце или не измерено независимым методом.

“–” = Градуировочную зависимость построить не удалось. МП = множитель правильности. СКО = среднеквадратическая ошибка.

*Стандартный образец. **Использовалась линия Mg I при 517.27 нм. ***Использовалась линия Mg I при 383.23 нм.

†По линии Li I при 670.78 нм (данное значение не учитывается при расчёте МП и СКО).

Для количественных измерений использовали линии, для которых наблюдалась лучшая линейность градуировочных зависимостей (они помечены знаком (*)) в Таблице 2.6). В Таблице 3.4 приведены результаты определения минеральных элементов в зоопланктоне в сравнении с данными ИСП–АЭС и ИСП–МС с разложением (предоставленными ИО РАН).

Содержание элементов, найденное методом ЛИЭС по градуировочным графикам, хорошо согласуется с данными ИСП–АЭС/МС для В, К, Са и Р. Наилучшее совпадение наблюдается для кальция и фосфора. Относительная погрешность в ЛИЭС в среднем составляет 16 %, в ИСП–АЭС/МС (в соответствии с ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 [290] и с учётом содержаний элементов в образцах) — 26 %. Наибольшие расхождения наблюдаются для натрия. Помимо матричных эффектов, в этом случае результат мог быть искажён из-за недостаточно полной отмывки образца от морской воды. Это обстоятельство влияет прежде всего на методы, требующие перевода пробы в раствор; с этим могут быть связаны, по-видимому, чрезвычайно завышенные содержания натрия по данным ИСП–АЭС (например, в образце АТ-71).

Таблица 3.5 содержит результаты из набора «Град» в виде значений c' с соответствующими значениями СКО и МП, рассчитанными для разных образцов и спектральных

Таблица 3.5.
Результаты анализа зоопланктона методом ЛИЭС с построением градуировочной зависимости (относительные значения c').

Прочерки означают, что расчётная концентрация меньше соответствующего доверительного интервала (см. пояснения к Таблице 3.4).

Элемент, аналит. линия (λ , нм)	АТ-71 № 5 № 5225 Седов				МП СКО	
В I 249.77	0.82	н/д	0.68	0.19	1.36	0.51
Са I 429.90	1.02	0.94	0.97	1.38	1.04	0.19
К I 404.41	1.07	1.39	0.48	0.87	1.20	0.39
Mg I 383.23	1.73	н/д	н/д	0.92	1.08	0.52
Na I 330.24	0.08	0.21	0.18	1.05	4.41	0.73
P I 253.56	0.85	1.12	0.95	2.51	1.13	0.76
Sr II 407.77	0.34	н/д	н/д	0.99	1.01	0.47
МП	1.86	1.17	2.31	1.64	2.18	–
СКО	0.52	0.42	0.51	0.67	–	0.55

линий. Здесь в качестве эталонных значений мы принимали данные ИСП–АЭС и ИСП–МС. Из таблицы можно видеть, как метрики МП и СКО дополняют друг друга. Например, для кальция МП = 1.04, что означает практическое отсутствие систематической погрешности для данной выборки в целом. Значение 1.38 в данном случае трактуется как выброс, потому что

$r_{0,9} = 1.27$. СКО показывает размах значений c' относительно единицы; его величина в большой степени определяется именно теми значениями, которые отбрасываются при расчёте МП. Например, для кальция СКО = 0.19, что соответствует $(1.38 - 1)/\sqrt{4}$ (см. уравнение 36). Таким образом, пара значений МП и СКО характеризует, с одной стороны, степень близости большей части полученных результатов к эталонным значениям (МП), а с другой стороны, степень отклонения всех результатов от эталонных значений

(СКО). Таблица 3.5 показывает, что наилучшие результаты методом ЛИЭС с градуировкой получаются для кальция.

Выше отмечалось, что при использовании ЛИЭС БОС возможен переход от соотношений элементов к их массовым концентрациям. Этого проще всего добиться, если рассмотреть соотношения элементов и основного компонента (в нашем случае углерода), считая его содержание постоянным. При этом содержание углерода в сухом веществе зоопланктона достаточно постоянно [283,291] и находится вблизи 45–50%. Более того, общее содержание органического углерода и зольность, как правило, доступны для проб, отобранных в ходе морских исследовательских экспедиций, поэтому их можно рассматривать как известные параметры. В расчётах мы использовали содержания углерода, приведённые в Приложении 1.

Результаты элементного анализа образцов зоопланктона и стандартных образцов биологических материалов, представленные в виде массовых концентраций с погрешностями, приведены в Приложении 3. В Таблице 3.6 собраны значения МП и СКО для образцов с жирной матрицей (4 образца зоопланктона и ГСО БОк-2) и всех вариантов обработки сигналов.

Таблица 3.6.
Показатели правильности для жирных образцов (АТ-71, № 5, № 5225, Седов, БОк-2).

Частица	λ , нм	Показатели правильности (для соотношений элемент/углерод)							
		МП				СКО			
		Град	БОС1	БОС1а	БОС2	Град	БОС1	БОС1а	БОС2
В I	249.77	1.4	1.4	2.6	2.1	0.51	0.55	2.3	1.4
Ca I	429.90	1.0	1.7	1.2	1.3	0.19	0.80	0.32	0.35
K I	404.41	1.2	2.1	3.1	2.1	0.39	1.7	3.3	1.5
Li I	610.37	–	1.9	1.6	1.3	–	1.1	0.70	0.50
Li I*	670.78	1.6	–	–	–	0.6	–	–	–
Mg I	383.23	1.1	1.7	1.9	1.4	0.52	0.71	0.91	0.45
Na I	330.24	4.4	2.8	2.7	1.8	0.73	4.6	1.4	0.62
P I	253.56	1.1	1.6	1.6	1.2	0.76	0.88	1.7	0.45
Sr II	407.77	1.0	1.9	1.7	1.6	0.47	0.52	0.61	0.57
	Все элементы	2.2	2.0	2.3	1.75	0.55	2.0	1.7	0.79
МП/СКО	металлы	2.3	2.2	2.2	1.83	0.49	2.1	1.6	0.78
	неметаллы	1.7	1.6	2.4	1.61	0.66	0.80	1.9	0.83

“–” = Градуировочную зависимость построить не удалось. МП = множитель правильности. СКО = среднеквадратическая ошибка.

Интегральные показатели выделены жирным шрифтом.

*Нормированное соотношение Li/C в зоопланктоне из залива Седова, равное 1.6, получено методом градуировки по линии Li I 670.78 нм. В остальных пробах зоопланктона содержание Li далеко выходило за верхнюю точку градуировочной зависимости (94–475 мкг/г против 1.44 мкг/г, соответственно), поэтому экстраполяция была бы необоснованной. Это значение не использовали для расчёта МП и СКО.

Таблица 3.7.

Показатели правильности для нежирных образцов (IAEA-407, ЛБ-1, Тр-1, ЭК-1).

Частица	λ , нм	Показатели правильности (для соотношений элемент/магний)					
		МП			СКО		
		БОС1	БОС1а	БОС2	БОС1	БОС1а	БОС2
B I	249.77	3.9	3.4	2.6	3.8	2.9	2.6
Ca I	429.90	1.4	1.6	1.4	0.50	0.70	0.38
K I	404.41	3.3	3.4	2.7	2.6	2.9	2.3
Li I	610.37	–	–	–	–	–	–
Mg I	383.23	1.2	1.2	1.2	0.19	0.30	0.21
Na I	330.24	2.3	2.6	1.9	1.8	2.3	1.0
P I	253.56	2.3	2.9	3.8	2.2	2.4	3.3
Sr II	407.77	1.5	2.0	1.9	0.40	1.0	1.0
МП/СКО	Все элементы	2.5	2.6	2.3	1.9	1.9	1.9
	металлы	2.1	2.1	1.7	1.4	1.5	1.0
	неметаллы	3.4	3.4	3.7	3.0	2.6	3.0

“–” = Градуировочную зависимость построить не удалось. МП = множитель правильности. СКО = среднеквадратическая ошибка.

Интегральные показатели выделены жирным шрифтом.

Общее значение МП для результатов анализа жирных образцов методом градуировки равно 2.2 (Таблица 3.6). Примечательно, что определение неметаллов оказывается более точным, чем определение металлов (МП 1.7 и 2.3, соответственно). Правильность большей части результатов, полученных с помощью подхода БОС1 (по пространственно-интегрированным сигналам) сопоставима с результатами анализа с использованием градуировочного графика, сохраняя ту же тенденцию в отношении металлов и неметаллов. Сходимость результатов для калия и натрия получается хуже, по-видимому, из-за сильного влияния вариаций параметров плазмы на их степень ионизации. Неметаллы, будучи трудноионизируемыми элементами, оказываются менее всего затронуты распространением погрешностей параметров плазмы, так что для них СКО изменяется относительно мало (с 0.66 до 0.80).

Учёт изменения температуры и электронной плотности в трёх зонах плазмы (БОС2) позволяет добиться наилучшей правильности, превосходя по значению МП для некоторых элементов (натрий, калий) даже результаты, полученные методом градуировочного графика. Метрики для металлов и неметаллов становятся близки друг ко другу (МП 1.8 и 1.6, СКО 0.78 и 0.83). СКО для БОС2 в 2–3 раза меньше, чем для традиционного варианта ЛИЭС БОС, и приближается к таковому для набора Град.

Методом ЛИЭС БОС удалось успешно определить литий — элемент, для которого невозможно было использовать градуировочную зависимость для анализа большинства исследуемых образцов из-за отсутствия подходящих по содержанию лития образцов сравнения (диапазон содержаний 94–475 мкг/г против максимального значения 1.44 мкг/г для образцов сравнения). Лишь в случае образца зоопланктона из залива

Седова ($c' = 1.6$) удалось использовать градуировочную зависимость с использованием резонансной линии Li I 670.78 нм. Это единственное значение (1.6) было исключено из расчёта МП и СКО в Таблице 3.6.

При коррекции мешающего влияния линии Ca I при 610.27 нм удалось добиться удовлетворительного согласия между результатами определения лития методом ЛИЭС и данными независимого анализа для образцов АТ-71 и № 5225 ($c' = 1.16$ и 1.36, соответственно, в наборе БОС2, см. Таблицу 3.4, стр. 93). Однако такая поправка возможна только в том случае, если интенсивности линий Li и Ca сопоставимы. Это достигается при соотношении масс Li/Ca не менее 1 : 1400. В очень богатых кальцием образцах (прежде всего в нежирных), где это соотношение было значительно ниже, коррекция может приводить и к ухудшению результатов.

Так как в условиях плазмы нежирных образцов (IAEA-407, ЛБ-1, Тр-1 и ЭК-1) верхние уровни некоторых переходов могут выпадать из ЛТР по критерию Мак-Виртера – Хейя (в частности, это относится к линии C I 247.85 нм с $E_{\text{возб.}} = 7.68$ эВ), в этих образцах мы рассмотрели возможность использования соотношения элемент/магний, опираясь на линию Mg I 517.27 нм, которая достаточно интенсивна, свободна от помех и для которой ΔE (см. уравнение 8, стр. 16) достаточно мала (2.4 эВ). В Таблице 3.7 приведены соотношения Э/Mg, определённые с помощью трех вариантов ЛИЭС БОС в нежирных СО. Интегральные показатели МП и СКО здесь больше, чем для отношений Э/С в зоопланктоне (Таблица 3.6), т.е. более точные результаты наблюдаются для более плотной плазмы жирных образцов, которые, вероятно, находятся ближе к равновесию, чем плазмы нежирных образцов. БОС2 по правильности стабильно превосходит БОС1 (по значению МП) для большинства рассматриваемых элементов. С учётом значений СКО можно констатировать, что в данном случае даже учёт пространственной неоднородности плазмы не позволяет избавиться от больших ошибок. Тем не менее, для Ca получены хорошие результаты. В нежирных образцах показатели, рассчитанные для металлов, лучше, чем для неметаллов. Это может быть связано с тем, что из-за более низкой электронной плотности могут нарушаться условия ЛТР в плазме. Среди изученных элементов наиболее точные соотношения Э/С получаются для Ca, Mg и P, а наиболее точные соотношения Э/Mg — для Ca.

В заключение отметим, что условия (T и N_e) в плазме на ранних временах её существования были примерно одинаковыми для всех исследуемых образцов (как для жирных, так и для нежирных). Поэтому регистрация сигналов в этом временном диапазоне позволяет уменьшить влияние матричных эффектов на результаты анализа

биологических тканей, подобно тому как это было показано Поповым и сотр. [58] для почв. Кроме того, при создании надёжной экспериментальной методики необходимо учитывать эффекты, связанные с ионизацией, поскольку и диагностика плазмы, и аналитические измерения основаны на сигналах легкоионизируемых элементов.

Разработанные способы определения состава биологических материалов также применены для анализа тканей рыб и водных растений из р. Неман (Беларусь) методом ЛИЭС с помощью градуировочных зависимостей [91]. Анализируемые образцы представляли собой материалы с существенно разными матрицами: твёрдые ткани рыб (кости, чешуя и плавники), мягкие ткани рыб (мышцы и печень) и растительные материалы. Градуировочные зависимости строили по стандартным образцам биологических материалов (см. Таблицу 2.2). Результаты ЛИЭС сравнивали с результатами РФС. Согласно полученным данным, ЛИЭС имеет преимущество в правильности определения для относительно лёгких элементов (P, K, Ca, Mn, Fe, Cu), уступая РФС при определении более тяжёлых элементов (цинка и стронция).

3.1.4. Влияние различных источников погрешностей на воспроизводимость ЛИЭС БОС.

Мы применили закон распространения ошибок для оценки вклада в общую погрешность анализа методом ЛИЭС БОС следующих переменных: температуры, электронной плотности, интенсивностей линий и вероятностей переходов. Дифференцируя уравнение 35 (стр. 81) по этим переменным, получаем погрешность соотношения элементов, а также вклады в неё, вносимые каждой переменной:

$$s_f^2 = s_T^2 \left(\frac{\partial f}{\partial T} \right)^2 + s_{N_e}^2 \left(\frac{\partial f}{\partial N_e} \right)^2 + s_{I_X}^2 \left(\frac{\partial f}{\partial I_X} \right)^2 + s_{I_Y}^2 \left(\frac{\partial f}{\partial I_Y} \right)^2 + s_{(gA)_X}^2 \left(\frac{\partial f}{\partial (gA)_X} \right)^2 + s_{(gA)_Y}^2 \left(\frac{\partial f}{\partial (gA)_Y} \right)^2. \quad (37)$$

Учитывая сложность выражения, расчёты были выполнены в численном виде в пакете Wolfram Mathematica 8, учитывая ионизацию до двухзарядных ионов включительно. Параметры электронных уровней в атомах и ионах брали из базы NIST [47] с учётом автоионизационных уровней.

Для соотношения элемент/углерод приведены результаты расчёта вкладов перечисленных четырёх источников в общую погрешность анализа для зоопланктона из залива Седова (Таблица 3.8). В качестве СОС для вероятностей переходов брали значения, указанные в базе NIST для классов точности (см. Приложение 2). В правом столбце таблицы выписаны значения относительной стандартной ошибки среднего (**ОСОС**),

возникающей в результате действия всех четырёх факторов. Вклады источников выражены в процентах от квадрата ОСОС, пропорционального дисперсии.

Таблица 3.8.
Источники погрешности при определении соотношений Э/С методом ЛИЭС БОС
в зоопланктоне из зал. Седова.

Частица	λ , нм	Источники (вклад в % от общей дисперсии соотношения Э/С)				Отн. СОС соотношения Э/С
		dT	dN _e	dI _{Э,С}	d(gA)	
B I	249.77	31.9	0.028	50.5	17.6	0.43
Ca I	429.90	51.6	0.11	29.9	18.4	0.59
K I	404.41	35.4	0.090	55.8	8.7	0.62
Li I	610.35*	59.5	0.15	26.6	13.8	0.48
Li I	670.78	40.8	0.066	52.9	6.2	0.72
Mg I	383.23	51.9	0.12	34.0	14.0	0.52
Na I	330.24	47.2	0.11	41.1	11.5	0.54
P I	253.56	19.3	0.026	32.0	48.7	0.44
Sr II	407.77	27.8	0.0028	48.8	23.4	0.37

* В образце АТ-71.

СОС = стандартная ошибка среднего.

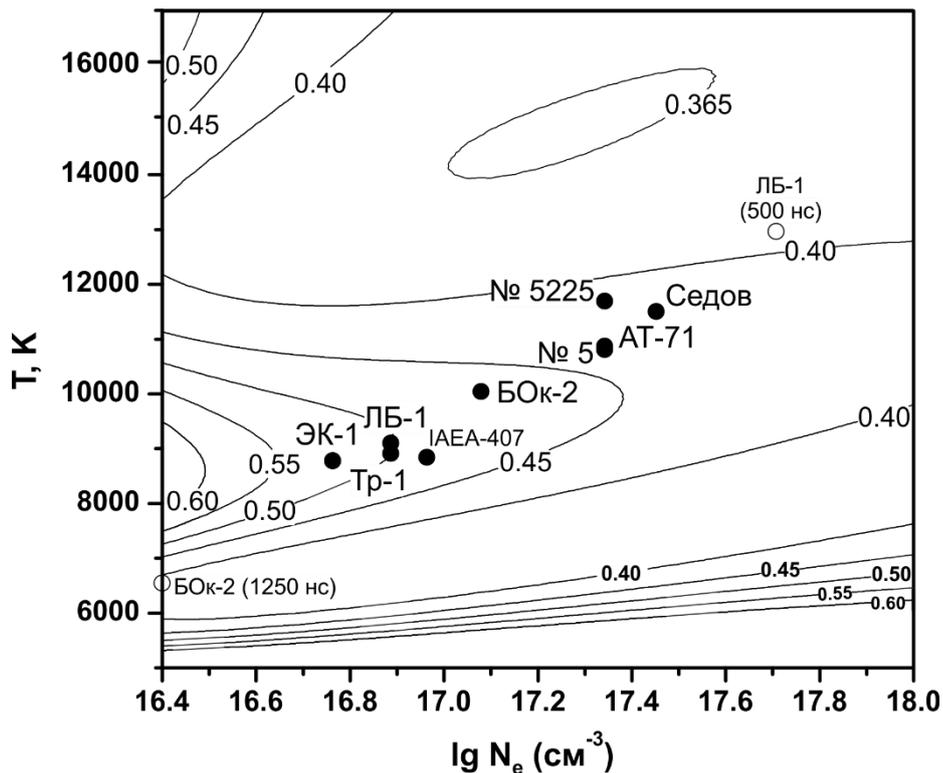


Рисунок 3.5. Контурная карта относительных стандартных ошибок среднего значения величины массового соотношения Sr/Mg, определяемого по линиям Sr II и Mg I при 407.777 и 517.268 нм, соответственно, в зависимости от параметров плазмы (см. уравнение 37). ОСОС для интенсивностей линий приняты равными 0.25. СОС для T принята равной 500 К, для N_e — $1 \times 10^{16} \text{ см}^{-3}$. Кружками отмечены параметры плазмы в анализируемых образцах (ср. Таблицу 3.1 и Рисунок 3.2).

Случайная погрешность анализа, выраженная в виде ОСОС, составляет в среднем 52 %, что согласуется с простой оценкой, приведённой выше. Наибольший вклад в

дисперсию соотношения Э/С (в среднем примерно по 40 %) вносят два источника: неопределённость температуры и интенсивностей эмиссионных линий. Оставшаяся часть погрешности (в среднем 18 %) обусловлена неопределённостью вероятностей переходов. Вклад электронной плотности пренебрежимо мал по сравнению с другими слагаемыми.

Влияние экспериментальной погрешности ($dI_{\lambda, c}$) можно снизить путём накопления большого числа параллельных спектров, насколько это позволяет время и механические характеристики образца. Влияние $d(gA)$, естественно, можно нивелировать только путём подбора переходов с хорошо известными вероятностями. Зависимость ОСОС соотношений элементов от параметров плазмы можно проследить с помощью контурных карт. В качестве примера на Рисунке 3.5 показана карта ОСОС для массового соотношения Sr/Mg, определяемого по линиям Sr II и Mg I при 407.777 и 517.268 нм, соответственно, в зависимости от параметров плазмы.

В данном случае можно выделить две области, благоприятных для анализа БОС в широком диапазоне N_e : при температурах около 6000–7000 и 11000–15000 К. Из-за особенностей испарения не все образцы попадают в области, где ожидаемая погрешность анализа минимальна. Условия эксперимента, при которых достигается минимальная погрешность регистрации сигнала (см. раздел 2.7) также находятся вне этих областей. При многоэлементном анализе неизбежно приходится искать компромисс между всеми перечисленными факторами.

3.2. Исследование взаимосвязей элементного и молекулярного состава зоопланктона методами ЛИЭС и СКР⁶.

3.2.1. Интерпретация спектров ЛИП и КР

Для изучения взаимосвязей между особенностями их элементного и молекулярного состава провели совместное изучение спектров лазерно-индуцированной плазмы и комбинационного рассеяния, полученных в широком спектральном диапазоне от 29 образцов зоопланктона (см. Таблицу 2.1).

Основными молекулярными компонентами морских ракообразных являются белки, жиры и хитин [266]. Высушенные организмы зоопланктона имеют интенсивную оранжево-красную окраску из-за присутствия каротиноидных пигментов, сигналы которых отчётливо видны в спектрах поглощения и/или КР [273] (см. ниже). Содержание лития колебалось от 0.2 до 716 (в среднем 146) мкг/г у *Calanoida* и от 0.3 до 4 (в среднем 1.3) мкг/г у остальных животных (кроме 51.4 мкг/г в смешанном зоопланктоне). Вещество тёмного цвета, по крайней мере в некоторых случаях, происходит из глаз и некоторых внутренних органов ракообразных, а светлый материал, скорее всего, относится к жировой ткани.

На Рисунке 3.6 показаны обзорные спектры лазерно-индуцированной плазмы и КР зоопланктона, усреднённые по таксонам [292]. Наш набор данных включал четыре различных таксона животных. Эмиссионный спектр морской улитки *Limacina helicina* наиболее богат линиями из-за наличия минерализованной раковины. В нём преобладают линии Са вместе с сильными сигналами Na, K, Mg и таких молекул, как СаОН и СаО (Рисунок 3.6, а). Отнесение атомно-эмиссионных линий выполняли по базе [47], молекулярных полос — по справочнику Пирса и Гейдона [293]. Ткани щетинкочелюстных червей (морских стрелок *Parasagitta elegans*), по-видимому, наименее минерализованы, поэтому одной из основных особенностей в их спектрах является присутствие

⁶ При подготовке настоящего раздела диссертации использованы публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении учёных степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

Nikolai I. Sushkov, Gábor Galbács, Krisztián Fintor, Nikolay V. Lobus, and Timur A. Labutin. A novel approach for discovering correlations between elemental and molecular composition using laser-based spectroscopic techniques // *Analyst*. 2022. V. 147. P. 3248. – 1.07 п.л. Вклад автора 70 % ИФ (Web of Science, JIF) – 3.6. ИФ (Web of Science, JIF) – 3.4.

Nikolai I. Sushkov, Gábor Galbács, Patrick Janovszky, Nikolay V. Lobus, and Timur A. Labutin. Towards automated classification of zooplankton using combination of laser spectral techniques and advanced chemometrics // *Sensors*. 2022. V. 22. P. 8234. – 1.85 п.л. Вклад автора 80 %. ИФ (Web of Science, JIF) – 3.4.

молекулярных полос C_2 и CN. Спектры *Calanoida* выделяются наличием интенсивных линий Li при 610.4 и 670.8 нм.

Спектр КР улиток *Limacina* (Рисунок 3.6, б) малоинтенсивен и неинформативен. В спектре *Parasagitta* наблюдаются отчётливые сигналы аминокислот при 755 и 945 cm^{-1} (вероятно, соответствующие триптофану и валину), сопровождаемые узкими

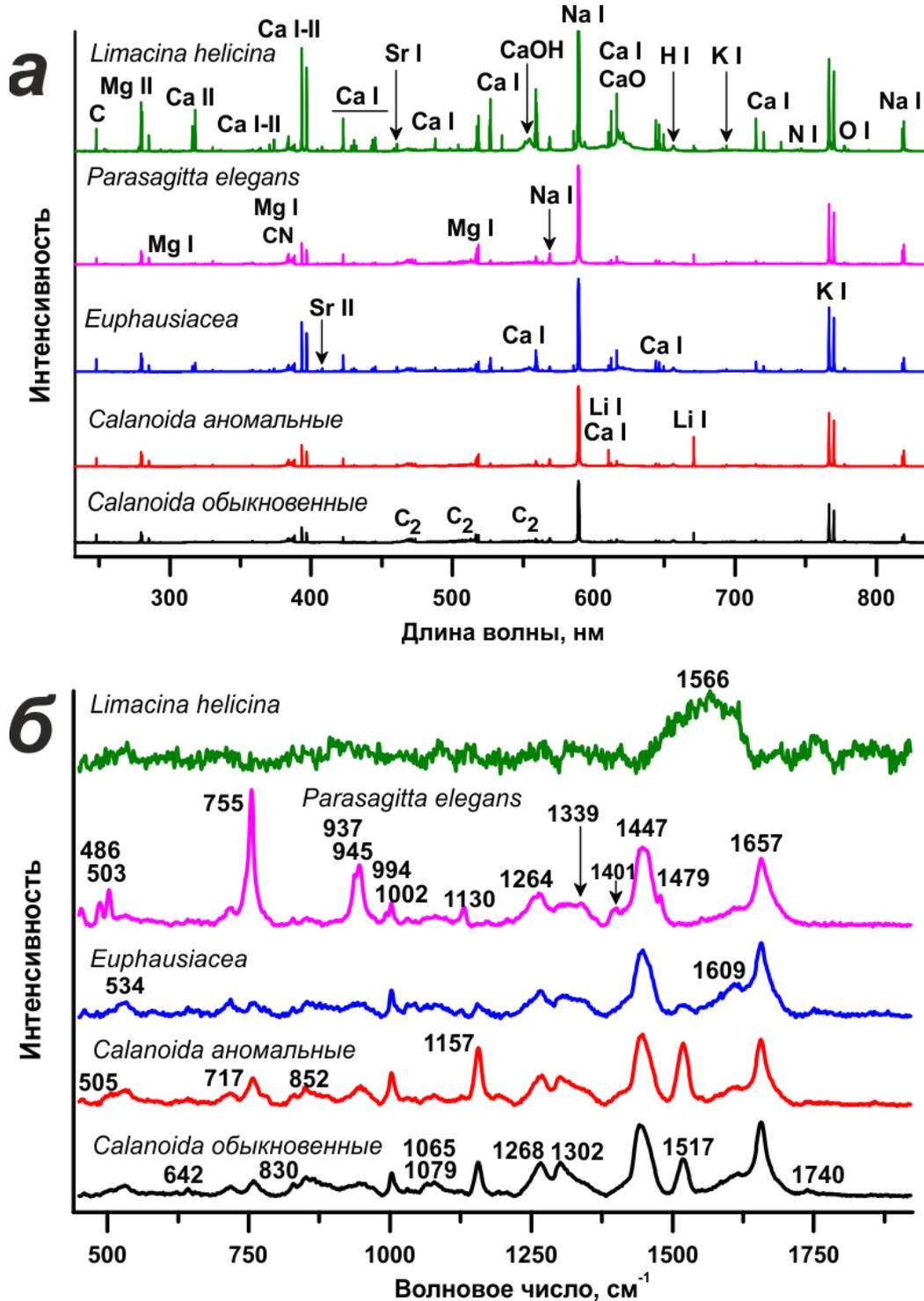


Рис. 3.6. Обзорные спектры (а) лазерно-индуцированной плазмы и (б) комбинационного рассеяния исследуемых животных (все из пятен промежуточной окраски). Спектры усреднены по соответствующим таксонам.

интенсивными пиками при 486, 503 и 3013 см^{-1} , свидетельствующими о присутствии групп NH_2 . У *Eurphausiacea* появляются умеренно сильные сигналы при 1609 см^{-1} (бензольные кольца) [274]. В спектрах *Calanoida* преобладают сигналы каротиноидных пигментов при 1004, 1157 и 1518 см^{-1} . Почти у всех животных наблюдаются сильные полосы насыщенных и ненасыщенных жирных кислот при 1446 и 1656 см^{-1} , соответственно [274,294]. Сигналы при 1268 и 1302 см^{-1} также относятся к жирным кислотам. Наличие подобных спектральных особенностей указывает на возможность классификации образцов (см. ниже). Полосы, идентифицированные в спектрах КР ракообразных, приведены в Таблице 3.9.

Таблица 3.9. Сигналы КР, идентифицированные в образцах [274,294].

Волновое число, см^{-1}	Соединения или фрагменты
758	триптофан
1004	фенилаланин, β -каротин
1157, 1193, 1519	β -каротин
1269, 1657	ненасыщенные жирные кислоты
1303, 1443	насыщенные жирные кислоты
1609	сопряжённые системы двойных связей
1740	$\text{C}=\text{O}$ в эфирах жирных кислот
2726	OH -содержащие соединения
2852, 2895, 2929, 2962	$\text{C}-\text{H}$ связи
3012	NH_2 или $\text{C}=\text{C}$

3.2.2. Анализ структуры данных ЛИЭС и СКР методом главных компонент и НМР

Для анализа данных с использованием различных хемометрических алгоритмов мы объединили спектры от тёмных, светлых и промежуточно окрашенных участков образцов (см. раздел 2.4) по принципу «голова к хвосту». Таким образом, каждому образцу соответствовал один составной спектр, содержащий всю имеющуюся в нашем распоряжении информацию об этом образце. Например, для эмиссионных спектров из трёх матриц размером 12275 строк \times 29 столбцов получалась матрица размером 36825 \times 29.

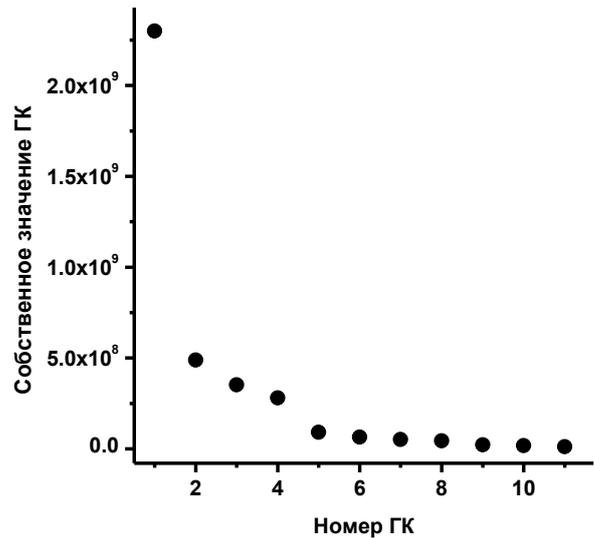


Рис. 3.7. Собственные значения ГК (эмиссионные спектры 29 образцов зоопланктона).

Чтобы изучить структуру данных и обеспечить успешное применение неортогональных методов и алгоритмов сочетания данных, мы использовали метод главных

компонент (МГК) [295]. График собственных значений для матрицы эмиссионных спектров (Рисунок 3.7) имеет излом между 4-й и 5-й ГК, что согласуется с наличием четырёх классов животных в выборке. Таким образом, для изучения данных можно рассматривать 4 или 5 компонент. Они объясняют, соответственно, 91 и 93 % дисперсии. Удобно рассматривать нагрузки, сортированные по длине волны из исходной матрицы спектров, т.е. представленные в виде «спектра» (рис. П1 в Приложении 4). Поскольку эмиссионные спектры и соответствующие нагрузки МГК охватывают широкий спектральный диапазон и содержат много спектральных линий небольшого числа элементов, удобнее выбрать несколько сигналов и рассматривать их интегральные интенсивности на т.н. лепестковых диаграммах (рис. П2). Выбранные нами характеристические эмиссионные линии и молекулярные электронно-колебательно-вращательные полосы и соответствующие диапазоны интегрирования перечислены в Таблице 3.10.

Таблица 3.10. Эмиссионные сигналы, выбранные для построения лепестковых диаграмм.

Частица	Центральная λ (нм) или диапазон λ	Частица	Центральная λ (нм) или диапазон λ
C I	193.0	K I	693.9
C ₂	560.7–563.7	Mg I	517.3
CN	408.3–420.0	Ca I	427.8–432.2
H I	650.5–663.7	Ca II	315.9
P I	214.9	Sr II	407.8
Li I	670.8	Cu I	324.75
Na I	567.8–572.0		

В нагрузках МГК преобладают резонансные линии (например, Na I 589 нм, K I 769 нм, Ca II 393 нм) и другие интенсивные переходы, склонные к самопоглощению, которое нарушает линейность сигналов. Поэтому мы исключили соответствующие спектральные диапазоны, как указано в Таблице 2.7, и область $\lambda > 947.7$ нм, занятую преимущественно шумным фоном. В разложении, полученном после этих операций, можно выделить 5–6 значимых ГК, описывающих 92–94 % дисперсии (Рисунок 3.8).

Области графиков нагрузок, соответствующих материалу разного цвета, могут сильно различаться по внешнему виду, что указывает на различие элементного состава тканей организмов зоопланктона. Имеются по крайней мере две ГК (№№ 2 и 3 на Рисунке 3.8) с хорошо выраженным сигналом Li, коррелирующим с Mg и Na, при этом в компоненте № 1 сигнал Li почти отсутствует. Фосфор и металлы коррелируют главным образом с сигналом C I, а не с молекулярными полосами C₂ и CN и не с линией водорода. Поэтому последние скорее представляют собой нехарактеристичные сигналы, интенсивность которых мало связана с составом образца. В первых пяти ГК прослеживается положительная корреляция между магнием и натрием.

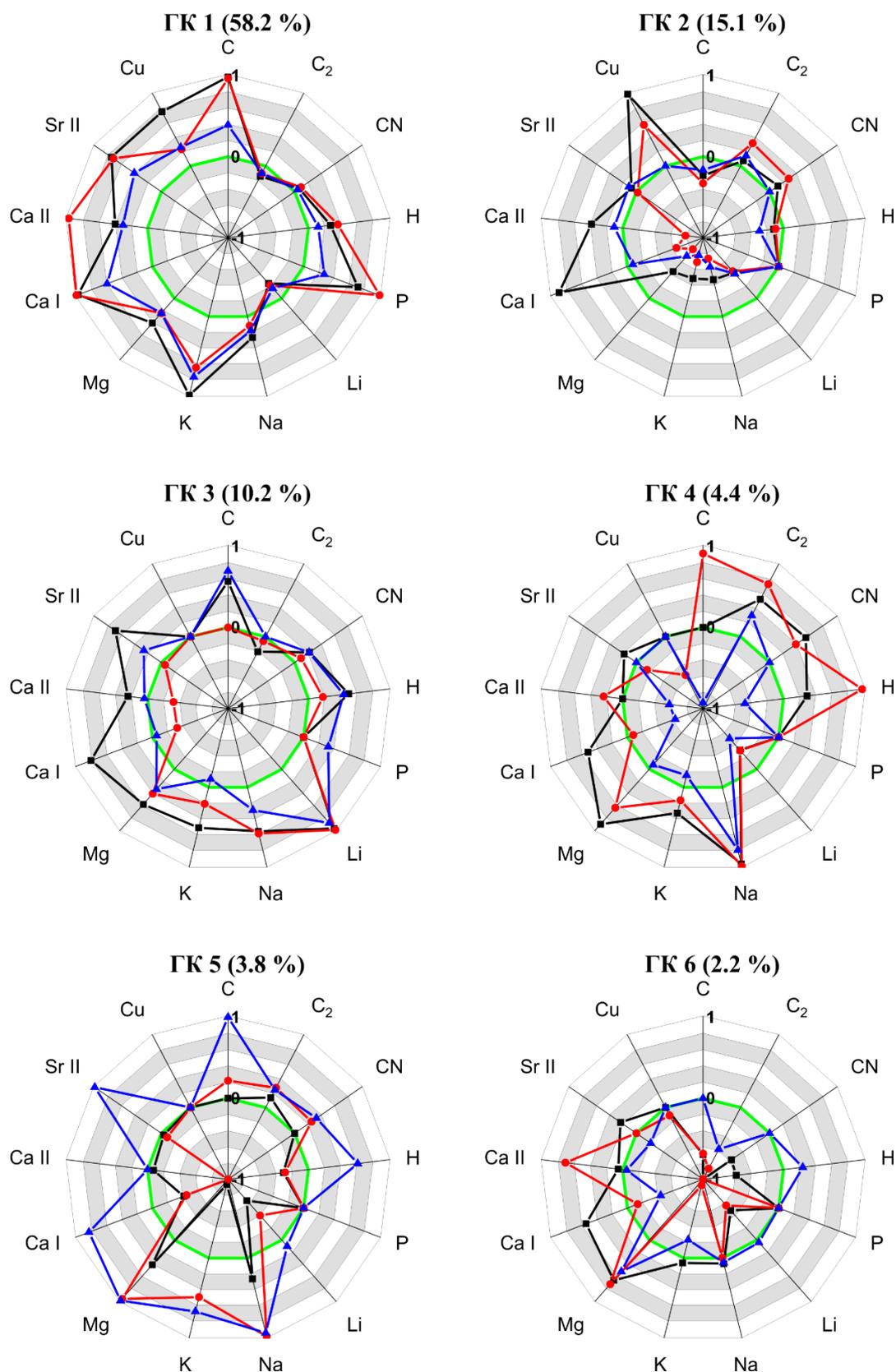


Рис. 3.8. Разложение эмиссионных спектров зоопланктона методом ГК (29 образцов, спектры после исключения резонансных линий). Показаны интегралы избранных сигналов на графиках нагрузок (см. Таблицу 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, сигналы от материала тёмного, промежуточного и светлого цвета. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

Исключение нелинейных сигналов из спектров положительно сказывается на информативности разложения данных методом ГК: кластеры, соответствующие таксонам животных, становятся гораздо более компактными и меньше перекрываются друг с другом (Рисунок 3.9). Можно было бы предположить, что дискриминация ракообразных *Calanoida* и *Euphausiacea* на Рисунке 3.9, б обусловлена аномально высоким содержанием Li, характерным для *Calanoida* [296,297]. Однако нетрудно заметить, что дискриминация в данном случае основана на значении ГК 1, в которой нагрузка для Li незначительна (см. Рисунок 3.8). Более того, щетинкочелюстные черви (морские стрелки) *Parasagitta*, не содержащие лития, на графике расположены близко к *Calanoida*. Дискриминация обусловлена скорее сигналами кальция и стронция.

Аналогично данным ЛИЭС, из спектров КР удалили область 2800–3000 см⁻¹, содержащую нехарактеристичные сигналы углеводородной цепи, и практически не содержащий сигналов диапазон 1921–2800 см⁻¹. Как и для эмиссионных спектров, эта

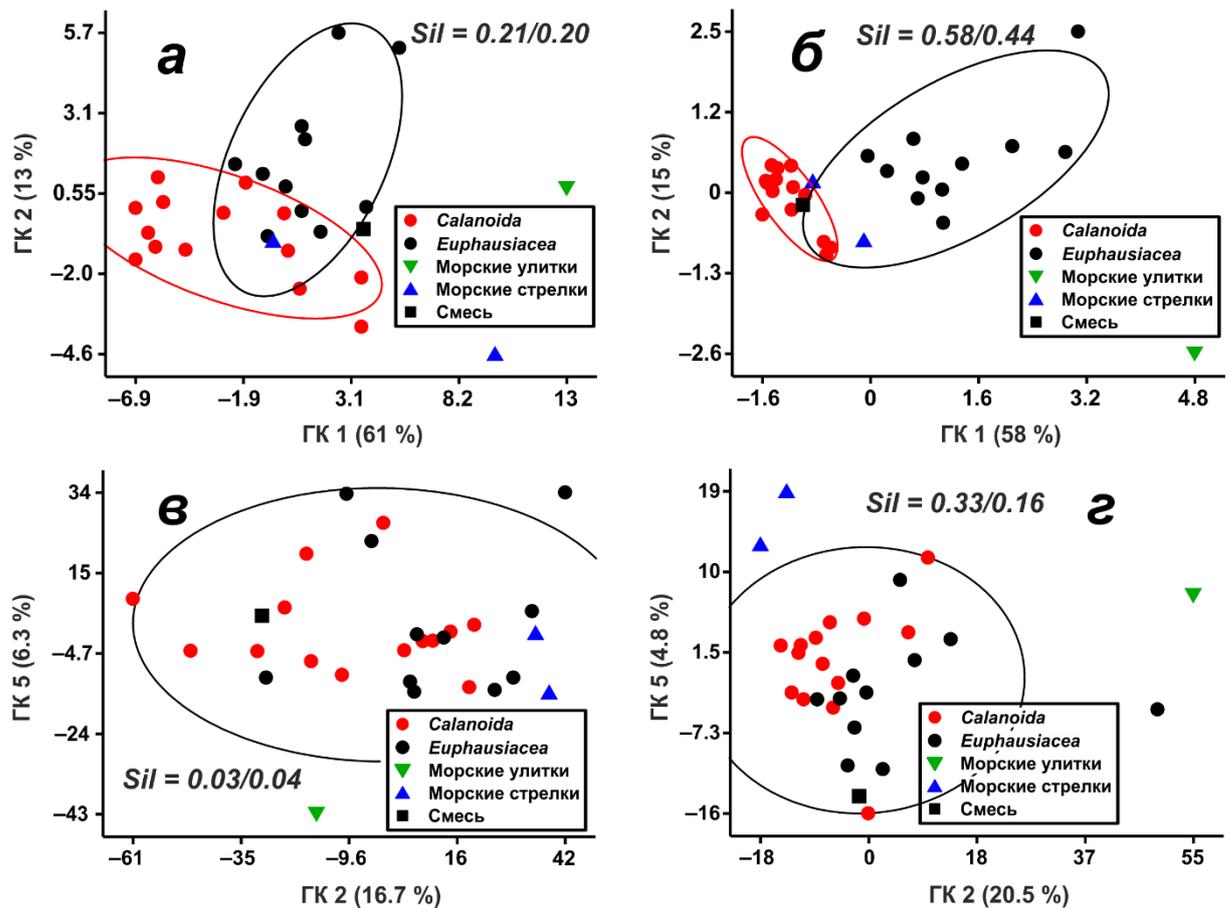


Рисунок 3.9. Графики счетов МГК для спектров ЛИП (а, б) и КР (в, г) зоопланктона до (а, в) и после (б, г) сокращения данных. На секциях а и б показаны доверительные эллипсы уровня 95 % для *Calanoida* и *Euphausiacea* (таксоны морских ракообразных), на секциях в и г эллипс рассчитан для всех ракообразных в целом. Силуэт (Sil) рассчитан для представленной плоскости (первое число), и для всего гиперпространства (второе число).

операция привела к улучшению кластеризации (ср. Рисунок 3.9, *в* и *з*). Поэтому в дальнейшем использовались только сокращённые спектры КР и ЛИП.

Наиболее характерная черта в разложении спектров КР (см. рис. П3) методом ГК — выделение в компоненту № 1 набора полос каротиноидов отдельно от большинства других сигналов. Возможно, так происходит из-за того, что красный пигмент образуется посмертно (ткани живых ракообразных — прозрачные с зеленоватым оттенком), т.е. содержание каротиноидов может не быть связано с каким-либо физиологическим процессом в живом организме. В менее выраженном виде сигналы каротиноидов присутствуют и в других ГК вместе с прочими сигналами (см. ГК 2). Сразу в нескольких компонентах присутствуют сигналы аминокислот (триптофана и валина) между различными компонентами. Наилучший график счетов получается именно в плоскости ГК 5 – ГК 2, в которой присутствуют сигналы аминокислот, а также, вероятно, ароматических фрагментов, дающих сигнал при 1617 см^{-1} (рис. П3).

Чувствительность спектров ЛИП и КР к таксономическим различиям можно оценить наиболее правильным образом, рассмотрев кластеризацию на графиках счетов в многомерном пространстве, образованном всеми статистически значимыми ГК. Количественной мерой качества кластеризации может служить метрика, носящая название *силуэта*, которая рассчитывается следующим образом [298]:

$$Sil = \sum_k \frac{1}{|C_k|} \sum_{i \in C_k} s_i, \text{ где } s_i = \frac{b_i - a_i}{\max(a_i, b_i)}. \quad (38)$$

Здесь s_i — силуэт для каждой точки, Sil — общее значение силуэта для всей системы кластеров, a_i — среднее расстояние данной точки i от других точек внутри кластера C_k , а b_i — среднее расстояние от i до всех точек за пределами этого кластера. Значения силуэта варьируются от -1 (худший случай, отсутствие кластеров) через 0 (перекрывающиеся кластеры) до $+1$ (отдельные компактные кластеры). Поскольку на основе спектров КР сравнительно тонкое различие ракообразных *Calanoida* и *Euphausiacea* оказалось невозможным, мы объединили их в кластер *ракообразных* и рассчитали силуэты для трёх кластеров: ракообразных, щетинкочелюстных червей и морских улиток. Для данных ЛИЭС рассматривали дискриминацию между отрядами ракообразных *Calanoida* и *Euphausiacea* (всего 25 образцов). На Рисунке 3.9 для каждого случая приведены значения силуэта: во-первых, для плоскости, образуемой данными ГК (первое число), и, во-вторых, для всего гиперпространства в целом (второе число).

Интересно, что данные ЛИЭС оказались более чувствительны к таксономическим различиям и лучше подходят для кластеризации, чем данные спектроскопии КР.

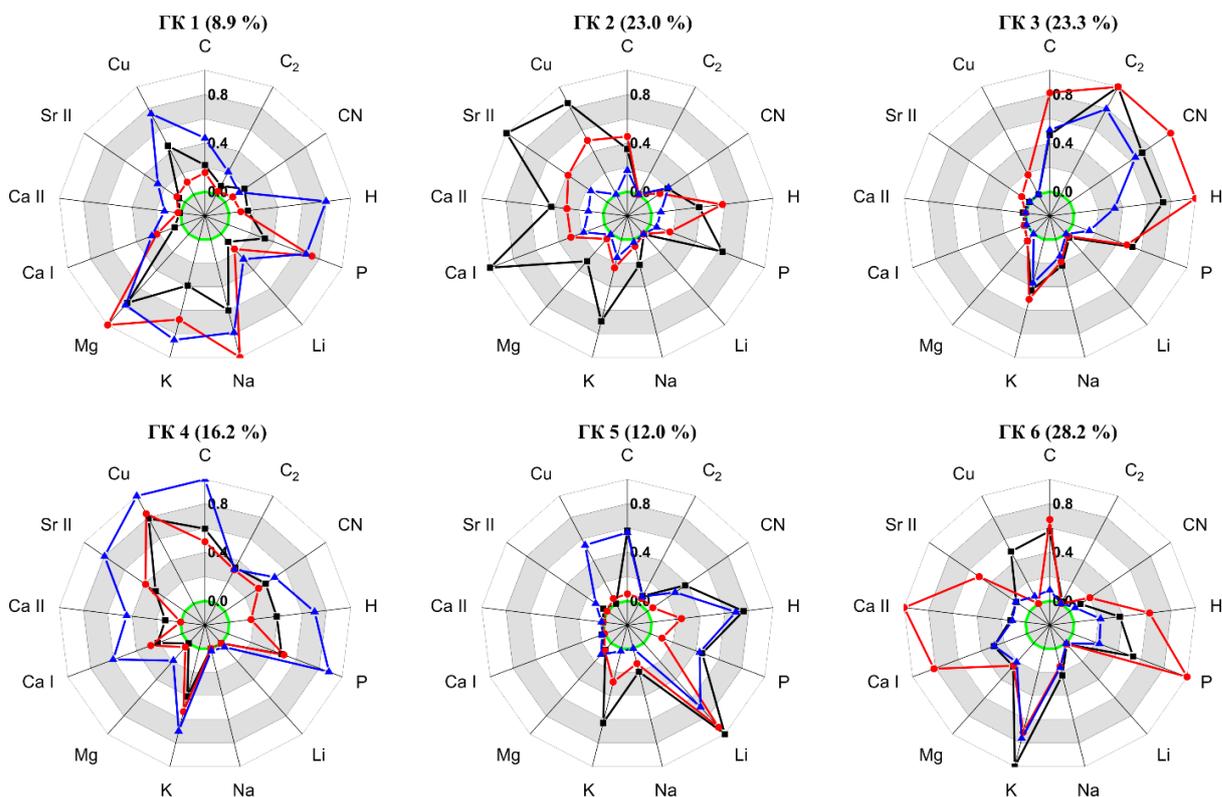


Рисунок 3.10. Лепестковые диаграммы для нормированных спектров нагрузок при разложении эмиссионных спектров зоопланктона методом НМР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, сигналы от материала тёмного, промежуточного и светлого цвета. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

Причиной этого может быть относительно низкая вариабельность и ограниченное количество сигналов КР.

Поскольку метод неотрицательного матричного разложения (НМР, англ. NMF) часто позволяет найти физически осмысленные компоненты (например, наборы сигналов, присущие химическому соединению или группе соединений) [247,254], мы использовали его для дополнительного анализа наших данных, чтобы лучше понять природу сигналов. Как и в МГК, полученные нагрузки для спектров ЛИП различаются для материала светлого, тёмного и промежуточного цветов (Рисунок 3.10). Сигнал Li присутствует вместе с K в одном из компонентов и с Na, Mg и K — в другом. Особое место занимает калий, присутствующий во всех компонентах и коррелирующий с несколькими группами элементов. Как и в результатах МГК, в одном из компонентов (№ 1 на Рисунке 3.10) одновременно присутствуют Mg и Na. Одновременное присутствие Ca и P в ГК 6 может говорить о наличии фосфатных минералов в экзоскелете ракообразных (этой особенности не было в результатах МГК).

Поскольку НМР даёт неортогональные компоненты, соответствующие графики счетов нужно строить не в прямоугольных, а в косоугольных координатах. Угол α между любой парой векторов нагрузок u и v определяется соотношением:

$$\cos \alpha = \frac{(u, v)}{\|u\| \|v\|}. \quad (39)$$

Отсутствие ортогональности приводит к тому, что рассмотрение графика счетов в плоскости, определяемой двумя векторами, имеет смысл только тогда, когда в разложении имеются только две компоненты, соответствующие этим векторам. Введение в

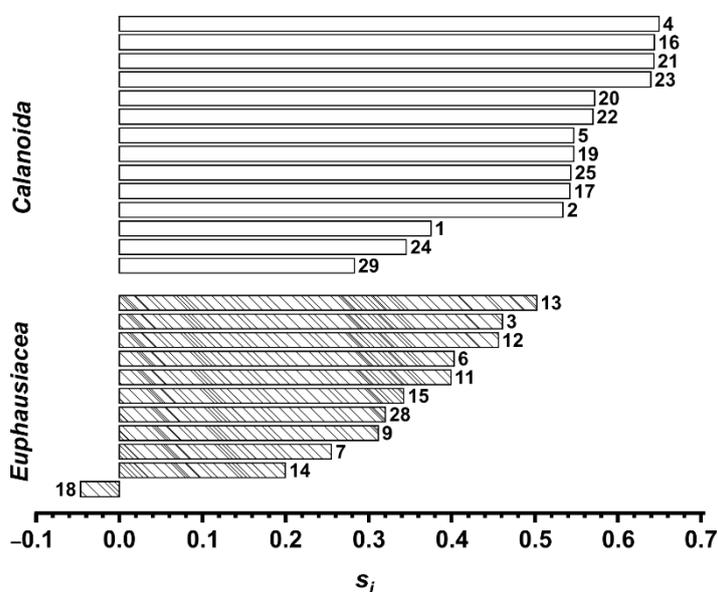


Рисунок 3.11. Силуэты, соответствующие двум классам ракообразных и рассчитанные на основе матрицы счетов из разложения эмиссионных спектров зоопланктона методом НМР (спектры после исключения резонансных линий), ср. Рисунок 3.10. Цифрами обозначены номера образцов (см. Таблицу 2.1, с. 64).

координатную систему новой оси, которая имеет ненулевые проекции на прочие оси и вдоль которой для каждой точки имеется ненулевая координата, приведёт к изменению координат вдоль уже имеющих осей. В нашем случае компонент в разложении больше двух, поэтому имеют смысл только силуэты, рассчитанные для всего имеющегося многомерного пространства. Так как при расчёте силуэта используется обычное евклидово расстояние, систему векторов из матрицы \mathbf{W} нужно сначала ортонормировать и получить соответствующую матрицу перехода \mathbf{T} :

$$\mathbf{WT} = \mathbf{W}', \quad (40)$$

где \mathbf{W}' — матрица, составленная из ортонормированных векторов. Матрица счетов \mathbf{H} в новом базисе будет выглядеть как

$$\mathbf{H}' = \mathbf{T}^{-1}\mathbf{H}. \quad (41)$$

Матрицу \mathbf{H}' уже можно использовать для расчёта многомерного силуэта.

В соответствии с описанным алгоритмом, для результатов разложения методом НМР матрицы спектров ЛИЭС (ср. Рисунок 3.10) мы получили $S_{11} = 0.44$ для классов *Calanoida* и *Euphausiacea*, т.е. такое же значение, как и в МГК (Рисунок 3.9, б). Таким образом, МГК и НМР обеспечивают одинаковое качество кластеризации, но МГК лучше описывает данные (объяснённая дисперсия 94 % против 83 % у НМР при одинаковом числе компонент). На Рисунке 3.11 изображены соответствующие силуэты для результатов НМР (т.е. величины s_i для каждого образца, см. уравнение 38). В целом можно сказать, что спектры ЛИЭС даже без привлечения данных КР позволяют

произвести хотя и не очень чёткое, но осмысленное деление образцов на кластеры, соответствующее их биологической классификации.

НМР и МГК, применённые к матрице спектров КР, дали схожие результаты. Численные значения силуэта также близки (Таблица 3.11), но кластеризация на основе спектров КР получается гораздо более размытой, чем для спектров ЛИЭС (см. строки 4 и 8).

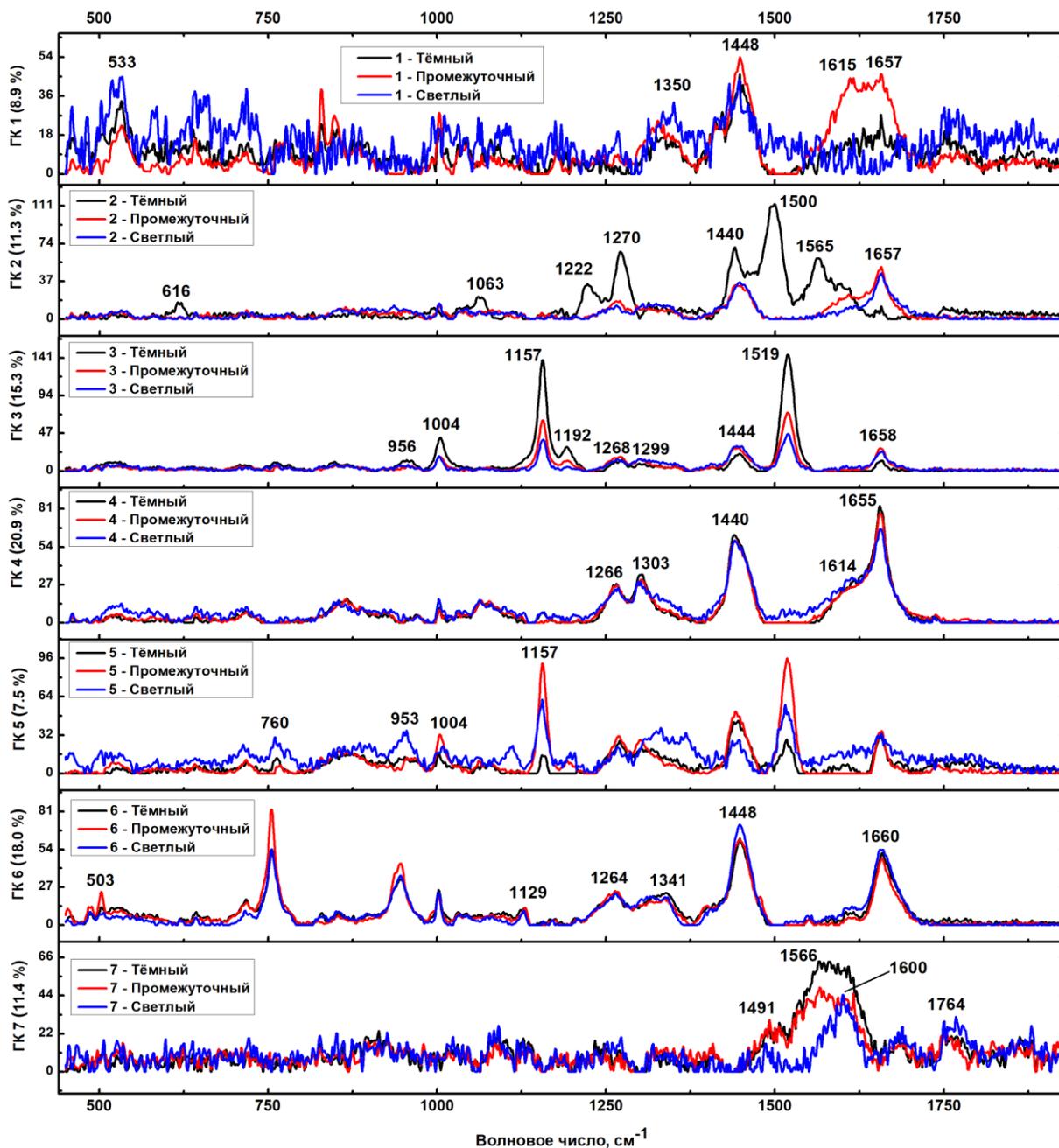


Рисунок 3.12. Результаты НМР для спектров КР. Черные, красные и синие линии соответствуют тёмному, промежуточному и светлому материалу, соответственно.

Нагрузки НМР приведены на Рисунке 3.12. Сигналы каротиноидов присутствуют в двух разных компонентах, а выраженные сигналы аминокислот присутствуют только в одной (№ 6). В то время как каротиноиды в данном случае можно считать

статистически почти независимыми от других веществ, аминокислоты в ГК 6 явно коррелируют с сигналами жирных кислот (1268, 1302, 1440, 1656 cm^{-1}). Последние проявляются и в отдельной компоненте (ГК 4). Интенсивность полос каротиноидов сильно зависит от цвета материала, что, вероятно, связано с тем, что именно эти соединения отвечают за окраску. ГК 7 очень похожа на спектр *Limacina helicina*, ГК 6 — на спектр щетинкочелюстных червей, ГК 4 — на спектр ракообразных *Euphausiacea* (Рисунок 3.6).

Таким образом, НМР даёт физически осмысленный результат. Доля объяснённой дисперсии в НМР и МГК сопоставима, хотя для НМР она несколько ниже (см. Таблицу 3.11).

Таблица 3.11. Результаты разложения спектров ЛИП и КР методами НМР и МГК.

№	Метод, набор данных	Число ГК	Объясн. дисп., %	<i>Sil</i> , %
Кластеры: Ракообразные — Морские стрелки — Морские улитки				
1	МГК: только СКР, полный	6	86	3.8
2	МГК: только СКР, сокращённый	7	84	16
3	НМР: только СКР, полный	6	87	1.7
4	НМР: только СКР, сокращённый	7	79	15
Кластеры: <i>Calanoida</i> — <i>Euphausiacea</i> (отряды ракообразных)				
5	МГК: только ЛИЭС, полный	5	93	20
6	МГК: только ЛИЭС, сокращённый	6	94	44
7	НМР: только ЛИЭС, полный	5	88	19
8	НМР: только ЛИЭС, сокращённый	6	83	44
9	МГК: ЛИЭС + СКР	5	78	36
10	НМР: ЛИЭС + СКР	5	72	38
11	ComDim–МГК: ЛИЭС + СКР	3	99.1	30
12	ComDim–АНК: ЛИЭС + СКР	3	96.9	25

«Полный набор» — исходные спектры; «сокращённый набор»: исключены диапазоны в соответствии с Таблицей 2.7 (стр. 83). Силуэты (*Sil*, %) рассчитаны для всего подпространства главных компонент и умножены на 100.

МГК = метод главных компонент; НМР = неотрицательное матричное разложение; ComDim = анализ общих компонент и удельных весов; АНК = анализ независимых компонент.

3.2.1. Совместный анализ данных ЛИЭС и СКР

Для нахождения корреляций между особенностями атомного и молекулярного состава образцов мы осуществили сочетание данных ЛИЭС и СКР. На первом этапе выполнили низкоуровневое сочетание, т.е. объединили матрицы спектров так, что

сигнал каждого образца теперь состоял из шести спектров — ЛИП и КР для материала каждого из трёх цветов. Перед объединением обе матрицы делили на их фробениусовы нормы. Анализ полученного набора данных начали с применения МГК. Описание полученных моделей представлено в Таблице 3.11. Значения многомерных силуэтов, для удобства, выражены в процентах.

На графиках счетов, соответствующих разложению объединённого набора данных с помощью МГК (шесть ГК, ОД 94 %), сохраняется уверенное разделение двух отрядов ракообразных, *Calanoida* и *Euphausiacea* (Рисунок 3.13). Образец смешанного зоопланктона попал в кластер веслоногих *Calanoida*, что естественно, поскольку этот таксон доминирует в акватории, где была взята проба. Морские стрелки также тяготеют к *Calanoida*, а морские улитки расположены в стороне от остальных кластеров, что тоже естественно, поскольку это панцирные животные с очень высоким содержанием кальция и малоинтенсивным спектром КР. Нагрузка из первой ГК (41 % ОД) содержит большинство сигналов испускания и рассеяния (Рисунок П4). Вторая (14 % ОД) и четвёртая (8 %) компоненты показывают связь между сигналами Li, Mg, Na, K, триптофана (Три) и каротиноидов. Нагрузки второй и третьей компоненты в части спектров КР похожи друг на друга и содержат полосы каротиноидов, однако в то время как в ГК 2 эти сигналы скоррелированы, в первую очередь, с сигналами лития и калия, в ГК 3 они же появляются вместе с сигналами Sr II и Cu. Веслоногие раки *Calanoida* богаты литием и каротиноидами, но бедны кальцием и медью; морские улитки, наоборот, богаты Ca, но бедны Li и каротиноидами: поэтому эти виды находятся в противоположных концах

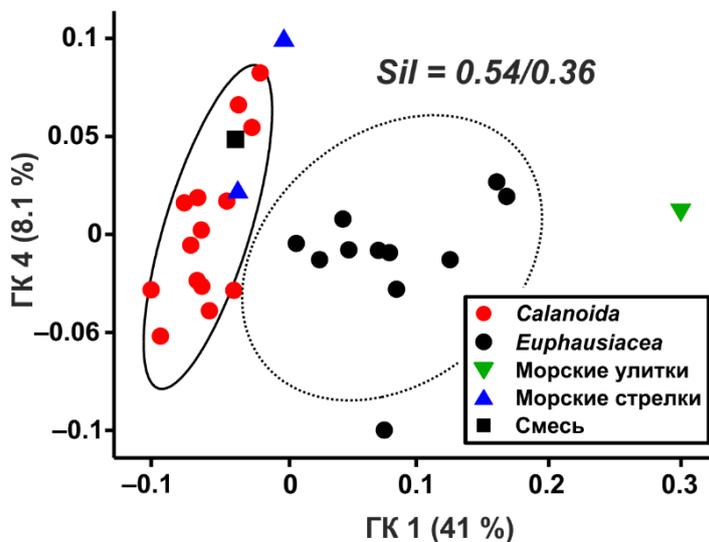


Рисунок 3.13. Графики счетов МГК для объединённых данных ЛИЭС и СКР. Прочие пояснения см. в подписи к Рисунку 3.9.

графика счетов (Рисунок 3.13).

Несмотря на то, что спектры комбинационного рассеяния морских стрелок *Parasagitta* имеют свои характерные полосы (а именно, при 755, 946, 1132, 3029 и 3042 cm^{-1}), их недостаточно для разделения таксонов в пространстве ГК. Эмиссионные спектры морских стрелок сходны со спектрами раков *Calanoida*, и, как следствие, эти образцы в большинстве случаев находятся рядом друг с другом на графиках

счетов. Графики счетов объединённого набора (ЛИЭС + СКР) мало отличались от

результатов, полученных только для эмиссионных спектров (без СКР), что является недостатком низкоуровневого объединения спектров разной природы. Таким образом, для кластеризации образцов по биологическим таксонам достаточно данных ЛИЭС. Объединённый набор данных был также изучен с помощью НМР. Его результаты (рис. П5) подтверждают описанные выше выводы, так как в них присутствуют две компоненты, содержащие сигналы Li. Одна из них предполагает корреляцию между Li, K и каротиноидами, а другая отражает связь между Li, Na, K, Mg и выраженными аминокислотными полосами при 718, 756 и 945 см⁻¹. Каротиноиды и аминокислоты присутствуют в двух разных компонентах (обе одновременно содержат Li); полосы жирных кислот чётко коррелируют с сигналами C I, C₂, CN и H I.

Результаты низкоуровневого объединения данных показывают, что необходим алгоритм, балансирующий вклады разнородных данных при их объединении. Результаты консенсусного МГК на шести блоках данных (спектры ЛИП и КР для тёмного, промежуточного и светлого материала) аналогичны обычному МГК в части комбинационного рассеяния, но в части ЛИЭС они отличаются (рис. П6). Наиболее важным является однозначное выделение корреляций Li–каротиноиды и Li–Три. Если проводить разложение спектров только 14 образцов веслоногих раков *Calanoida* (рис. П7), дисперсия сигналов Li описывается первыми двумя ГК. Полосы каротиноидов коррелируют с Li в одной из компонент положительно, а в другой — отрицательно. Можно предположить, что каротиноиды лишь частично связаны с Li. Разложение методом НМР того же поднабора (рис. П8) также даёт две ГК, содержащие сигналы Li, в одном случае вместе с каротиноидами, в другом — вместе с аминокислотами и другими сигналами. Кроме того, видна также корреляция Li–K.

Итерационные многоблоковые алгоритмы способны учитывать особенности сигналов в каждом блоке [264,299]. Таким алгоритмом является метод общих компонент и удельных весов (ComDim). Хотя известно о его применении к данным ИСП–МС [300], в большинстве случаев его используют на данных молекулярной спектроскопии, ЯМР или электрохимии. Таким образом, наше исследование, включающее анализ атомно-эмиссионных спектров, вероятно, является первым применением ComDim в этом направлении.

Мы использовали ComDim в двух вариантах: ComDim–МГК и ComDim–АНК. Как отражено в этих названиях, они различаются в той части алгоритма, которая отвечает за расчёт скрытых векторов (см. раздел 1.5). Анализ независимых компонент (АНК) в данном случае подобен НМР и приводит к неортогональным компонентам,

поэтому можно ожидать, что результаты будут иметь более чёткий физический смысл, чем при применении ортогональных методов. Оба варианта реализованы в среде MATLAB группой проф. Д.Н. Рутледжа и использовались с его разрешения. И в ComDim–МГК, и в ComDim–АНК были рассчитаны три общих компоненты (ОК; Рисунок П9 и Рисунок 3.14, соответственно); одна из компонент (например, Рисунок 3.14, д) содержит преимущественно шум в части КР, т.е. неинформативна для изучения корреляции между элементарным и молекулярным составом. В остальных компонентах видна положительная корреляция между Li, полосами каротиноидов и слабыми сигналами аминокислот. Последняя особенность спектров КР преобладает в материале светлого

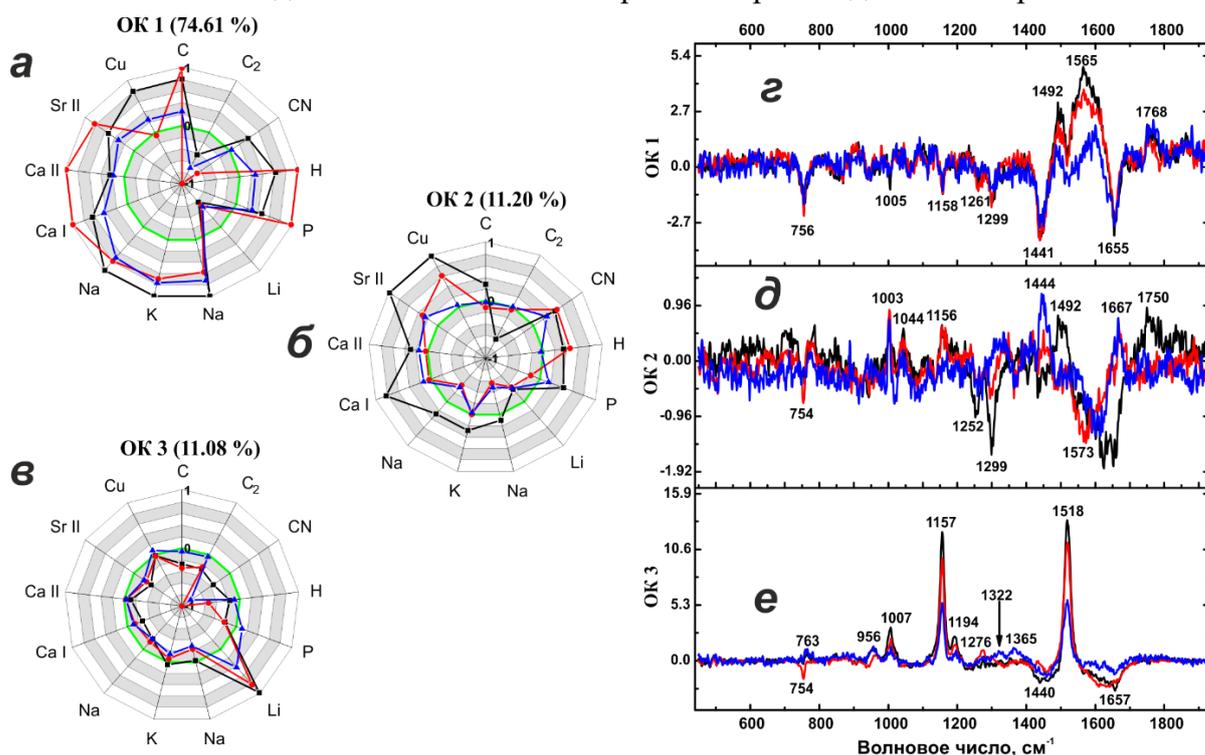


Рисунок 3.14. Нагрузки ComDim–АНК для объединённых спектров ЛИП и КР зоопланктона (29 образцов): а, б, в: интегралы избранных эмиссионных сигналов (см. Таблицу 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; г, д, е: участки, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

цвета. В ComDim–АНК получилась самая простая для интерпретации (среди всех полученных нами результатов) эмиссионная часть, состоящая почти исключительно из сигналов Li (Рисунок 3.14, в). В спектре светлого материала оба варианта ComDim вместе с сигналами каротиноидов выделили широкую полосу при 1370 см^{-1} (она может соответствовать хитину).

Объяснённая дисперсия (ОД) в ComDim весьма высока (более 99 %). В то время как полученные графики нагрузок легко интерпретируются и поэтому весьма полезны для поиска корреляций между химическими компонентами, качество кластеризации,

исходя из значений силуэтов, не превосходит результаты МГК и НМР (см. Таблицу 3.11).

Дополнительно мы рассмотрели разложение матрицы, составленной только из спектров образцов *Calanoida*, методами ComDim–МГК и ComDim–АНК. Большинство эмиссионных линий и полос КР внесли вклад в первую ОК; отметим, что полосы при 756, 880, 948 и 1655 см^{-1} , соответствующие аминокислотам и другим карбоксилатным соединениям, появились исключительно в этой компоненте (Рисунки П10, П11). Вторая ОК помещает эмиссионные сигналы Li, K и P вместе с полосами КР каротиноидов и аминокислот. В светлом материале присутствует полоса при 1370 см^{-1} . Нагрузки для тёмного, промежуточного и светлого материала не очень сильно коррелируют друг с другом в эмиссионной части, тогда как в части комбинационного рассеяния они больше похожи друг на друга.

При подробном рассмотрении выявленных корреляций между Li и другими компонентами тканей животных (в первую очередь, раков *Calanoida*) можно отметить следующее. Наиболее заметные корреляции наблюдаются для сигнала Li в светлом материале. Так как полоса при 1370 см^{-1} тоже появляется в светлом материале и в компонентах, связанных с Li, можно предположить особую роль именно этого материала в накоплении лития. На Рисунке 3.15, а представлена зависимость Li–триптофан (758 см^{-1}), линейная в диапазоне концентраций до 70 мг/кг. При более высоких концентрациях (полые кружки) зависимость теряется (что может указывать на изменение режима накопления Li). Полоса КР при 640 см^{-1} (которая может быть приписана нескольким соединениям, таким как тирозин, пролин или лимонная кислота), а также сигналы каротиноидов и калия растут симбатно с сигналом Li во всем диапазоне концентраций последнего (б, в, е).

Кроме того, интенсивность полосы при 948 см^{-1} (вероятно, сигнала валина) коррелирует с сигналом Li. Сигнал валина резко возрастает с увеличением содержания Li до 20 мкг/г на участках тёмного и промежуточного цветов, а затем рост значительно замедляется. Для удобства восприятия эта зависимость представлена в логарифмических координатах (Рисунок 3.15, з). Наконец, интересно, что триптофан коррелирует не только с Li в *Calanoida*, но и с медью в *Euphausiacea* — здесь речь идёт также о в светлых участках (Рисунок 3.15, д). При этом Li и Cu не накапливаются одновременно одними и теми же животными (это также видно из Рисунка 2.7, стр. 73). Литий в значимых

концентрациях содержится в веслоногих раках *Calanoida*, а медь — в высших раках *Euphausiacea*. Рисунок 3.15, *e* иллюстрирует эту взаимосвязь.

Чтобы исключить возможность построения моделей, определяемых только сигналом лития, а также оценить достоверность выявленных особенностей в составе организмов зоопланктона, мы проверили предсказательную способность хемометрических моделей в отношении концентраций лития (в образцах *Calanoida*: №№ 1, 2, 4, 5, 16, 17, 19–25 и 29, см. Таблицу 2.1, стр. 64), удалив его сигналы (линии при 460.3, 610.3 и 670.7 нм) из исходных спектров. Рассмотрев графики счетов, можно наблюдать, зависят ли координаты образцов от концентрации Li. На Рисунке 3.16 показан результат, полученный методом МГК на объединённых данных ЛИЭС и СКР.

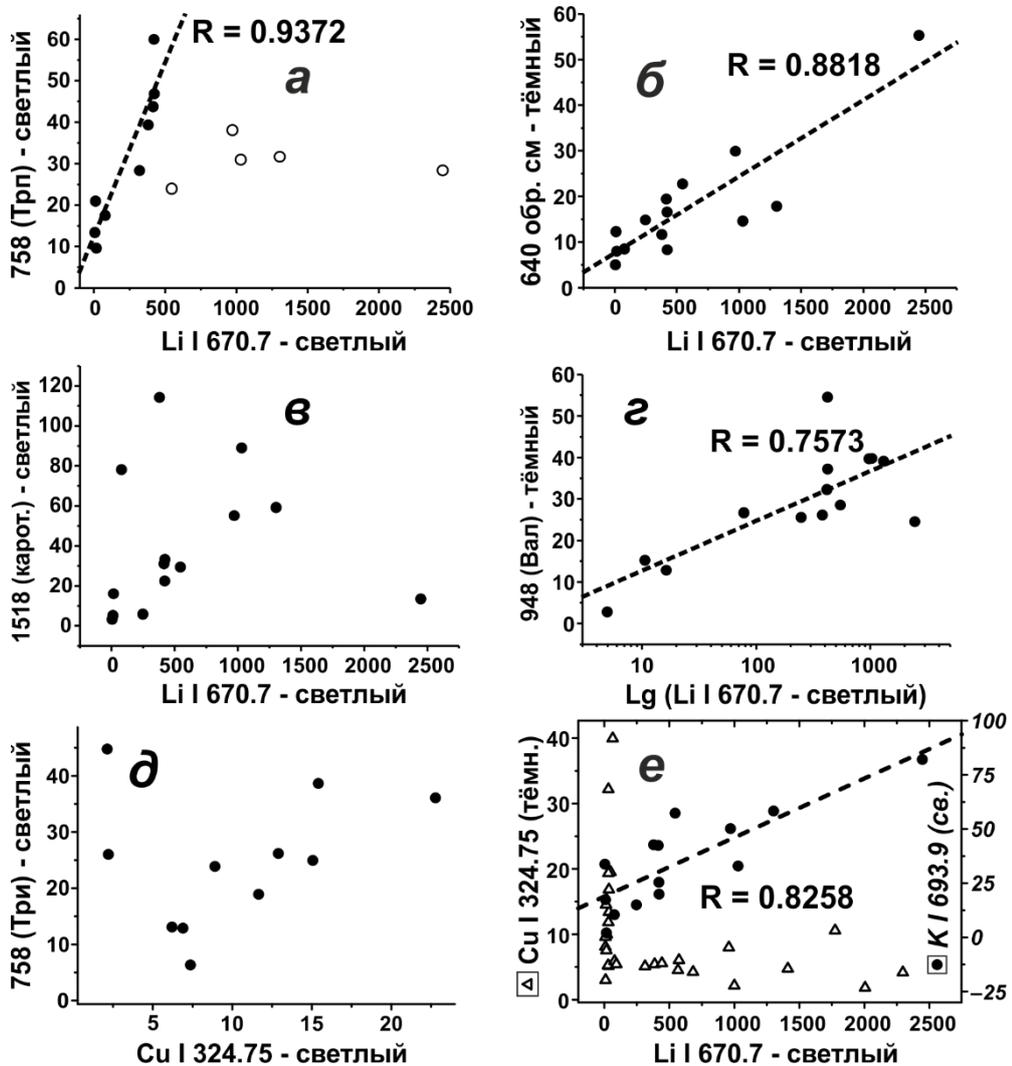


Рисунок 3.15. Корреляции между химическими компонентами тканей *Calanoida* (а–г, е) и *Euphausiacea* (д), а: Li – Три (758 см⁻¹); б: Li – Тир/Про/лимонная кислота (640 см⁻¹); в: Li – каротиноиды (1518 см⁻¹); з: Li – Вал (948 см⁻¹); д: Cu – Три (758 см⁻¹); е: К (точки), Cu (треугольники, все 29 образцов) – Li. Полыми кружками изображены точки, не включённые в регрессию.

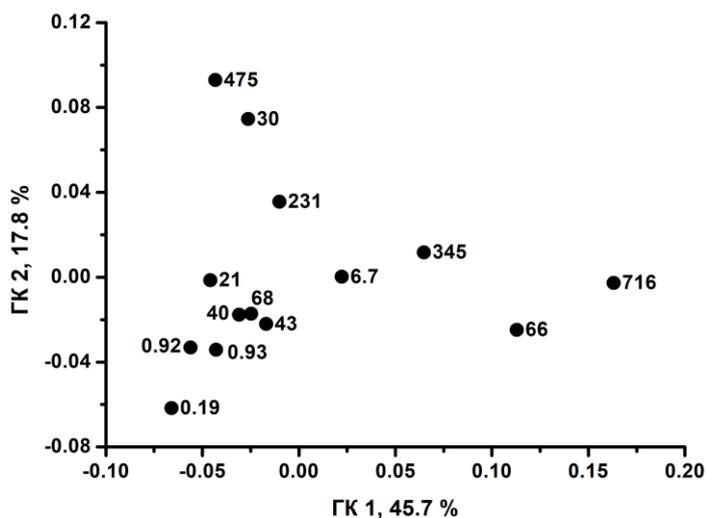


Рисунок 3.16. График счетов для разложения объединённого набора данных ЛИЭС и СКР для *Calanoida* (14 образцов) без сигналов Li методом МГК (ср. Рисунок П12). Числа при точках — концентрации Li в мкг/г.

Содержание Li в целом растёт вдоль диагонали графика. Несмотря на отступления от закономерности, имеются группы точек с очень низким и умеренным содержанием Li. Образцы с очень высоким содержанием Li сильно рассеяны, что, вероятно, отражает тот факт, что изменение состава организмов при накоплении лития может происходить по разным схемам, соответствующим как ГК 1, так и ГК 2. Что касается нагрузок (Рисунок П12), ГК 1 содержит полосы валина,

каротиноидов и отрицательные сигналы жирных кислот. Полоса триптофана здесь практически отсутствует. Соответствующая эмиссионная часть почти не содержит сигналов, кроме небольших нагрузок для CN, K и C₂. Сигналы металлов проявляются в других компонентах (в частности, в ГК 2), где им сопоставлены наборы весьма шумных сигналов КР. Таким образом, в отсутствие сигналов лития МГК всё равно выделяет в спектрах КР соответствующий ему набор полос, практически не сопоставляя его каким-либо другим элементам.

Для четырёх образцов (№№ 1, 2, 17 и 29) с наиболее высокими концентрациями Li (230–715 мкг/кг) обнаруживаются корреляции с жирными кислотами. Отношение концентраций ненасыщенных и насыщенных жирных кислот можно представить в виде соотношения интегралов их полос при 1657 и 1443 см⁻¹, соответственно. Для светлого материала образцов *Calanoida* это значение составляет 0.57±0.05, но для четырёх аномальных образцов оно линейно уменьшается от 0.7 до 0.4 в зависимости от содержания Li. Существуют и другие спектральные особенности, указывающие на относительную обеднённость ненасыщенными соединениями, такие как отсутствие полосы при 3016 см⁻¹ и более слабой полосы при 1620 см⁻¹. Более того, по данным МС–ИСП, эти образцы содержат значительно меньше алюминия и больше калия и фосфора по сравнению с остальными образцами (см. Приложение 1). Известно [266], что накопление лития достигает максимума в конце зимы, когда животные готовятся к переходу от паузы к периоду активного питания. При этом рачки всплывают из глубины в несколько сотен метров в приповерхностные слои воды, что сопровождается уменьшением плотности животных, вызванной в том числе и накоплением лития. Поэтому можно

предположить, что «аномальные» образцы представлены животными, которые уже израсходовали все запасы жиров.

Таким образом, все использованные хемометрические методики выявили в целом одни и те же корреляции, однако использование метода ComDim для совместного анализа данных ЛИЭС и СКР привело к относительно легко интерпретируемым результатам. Сигналы лития изменяются по интенсивности в основном независимо от большинства других химических элементов; при этом, помимо взаимосвязи лития с содержанием ряда аминокислот и каротиноидов, в НМР выделилась корреляция Li–К.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были исследованы возможности сочетания методов ЛИЭС и СКР для характеристики биологических объектов на примере морского зоопланктона, а также других животных и растительных материалов; соответствующие спектры содержат значительное число информативных сигналов. Мы показали возможность прямого полуколичественного определения Li, B, Na, Mg, P, K, Ca и Sr в изучаемых образцах методом ЛИЭС, в том числе без образцов сравнения. Показана эффективность алгоритмов хемометрики (прежде всего МГК и НМР) для биологически осмысленной кластеризации образцов зоопланктона на основе спектров ЛИП и КР. Данные ЛИЭС оказались существенно более полезными для этой задачи, чем спектры КР; сочетание данных в этом случае оказалось излишним.

Поиск взаимосвязей между особенностями элементного и молекулярного состава осуществляли для образцов морского зоопланктона. Исследуемые образцы состояли преимущественно из ракообразных, среди которых преобладали представители таксонов *Calanoida* и *Euphausiacea*, принадлежащих к классам веслоногих и высших раков, соответственно. Кроме того, имелись образцы морских стрелок (щетинкочелюстных червей) *Parasagitta* и морских улиток *Limacina*. Все образцы содержали в значительных и умеренно варьирующихся концентрациях такие эссенциальные элементы, как фосфор, натрий и калий. Концентрации других элементов, таких как кальций, стронций, бор и особенно литий, существенно изменялись от образца к образцу (различия достигали многих десятков раз).

Методом СКР света мы получили информацию о молекулярном составе анализируемых образцов. Почти у всех животных наблюдаются яркие полосы насыщенных и ненасыщенных жирных кислот; кроме того, присутствуют сигналы аминокислот и пигментов. В спектрах морских стрелок *Parasagitta* сигналы аминокислот (вероятно, триптофана и валина) особенно отчетливы и сопровождаются узкими интенсивными пиками NH₂-групп. У раков *Euphausiacea* появляются умеренно сильные сигналы бензольных

ядер, а сигналы пигментов и аминокислот довольно слабые. В спектрах раков *Calanoida* преобладают сигналы каротиноидных пигментов. Спектр КР улиток *Limacina* малоинтенсивен и неинформативен.

Для первоначального изучения структуры данных мы применили метод главных компонент (МГК) к блокам спектров ЛИП и КР по отдельности и получили 6–7 статистически значимых компонент. Кластеризация образцов на соответствующих графиках счетов оказалась значительно лучше для данных ЛИЭС, чем для данных СКР: ЛИЭС позволила различить кластеры раков *Calanoida* и *Euphausiacea* (по сигналам кальция, стронция и меди), тогда как по данным СКР все образцы ракообразных слились в один кластер. С другой стороны, СКР, благодаря сигналам аминокислот, позволила отличить морских стрелок от ракообразных, в отличие от ЛИЭС.

Анализ объединенных данных (ЛИЭС+СКР) методом главных компонент указывает на связь между сигналами Li, Mg, Na, K, триптофана и каротиноидов. Метод НМР для объединённого набора показывает те же корреляции между сигналами, что и МГК, подчёркивая корреляции Li и K (она может быть связана с работой внутриклеточного натрий-калиевого насоса [301]), а также полос жирных кислот и сигналов C I, C₂, CN и N I.

Показано, что анализ общих компонент и удельных весов (ComDim) является более гибким алгоритмом для работы с многоблоковыми данными. С его помощью удалось получить наиболее простые для интерпретации графики нагрузок. В объединённых данных ЛИЭС и СКР ComDim выделил три компоненты (объяснённая дисперсия более 99 %). Из их рассмотрения следует, что сигналы лития, присутствующего в аномально высоких концентрациях в раках *Calanoida*, весьма слабо коррелируют с сигналами прочих металлов, но при этом чётко коррелируют с сигналами пигментов, аминокислот и, возможно, хитина. Наконец, применение МГК к объединённым данным ЛИЭС и СКР для раков *Calanoida*, из которых были удалены сигналы лития, всё равно приводит к появлению компоненты, содержащей в спектрах КР соответствующий ему набор полос, практически не сопоставленный каким-либо эмиссионным сигналам. На соответствующем графике счетов образцы группируются по содержанию лития.

Кроме того, выявлена взаимосвязь содержания меди в тканях раков *Euphausiacea* с триптофаном. Накопление лития раками *Calanoida* также, по-видимому, связано и с валином. В отличие от лития, для меди такой зависимости не наблюдается. Метод СКР позволяет оценивать отношение концентраций ненасыщенных и насыщенных жирных кислот через соотношение интегралов их полос при 1657 и 1443 см⁻¹, соответственно. Будучи примерно одинаковым для большинства образцов зоопланктона (0.57±0.05), это

соотношение линейно уменьшалось (с 0.7 до 0.4) в зависимости от содержания лития в образцах, наиболее богатых литием. Существуют и другие спектральные особенности, указывающие на относительную обеднённость этих образцов ненасыщенными соединениями, такие как отсутствие полосы при 3016 см^{-1} и более слабой полосы при 1620 см^{-1} . С другой стороны, эти образцы содержат больше калия и фосфора по сравнению с остальными образцами. Эта корреляция ещё ожидает своей интерпретации.

Применение таких относительно редких в аналитической химии алгоритмов, как NMP, ComDim–МГК и ComDim–АНК, к объединённым данным ЛИЭС и СКР позволило предложить способы выявления корреляций между элементарным и молекулярным составом анализируемых образцов. Выявленные закономерности показывают возможность использования предложенного сочетания методов для выявления особенностей изменения элементного и вещественного состава в рамках жизненного цикла организмов зоопланктона, а также могут использоваться как основа для дальнейших исследований роли аминокислот, особенно относительно редкого триптофана, в накоплении металлов. Учитывая наличие нескольких коммерчески доступных портативных приборов для ЛИЭС и спектроскопии КР, полученные результаты представляют практический интерес для морских экспедиций.

По результатам диссертационной работы можно сформулировать следующие основные **выводы**:

1. Спектры плазмы, возникающей при абляции зоопланктона, состоят почти исключительно из эмиссионных линий щёлочноземельных и щелочных элементов, а также фосфора и двухатомных молекул (C_2 , CN , CaO). Сигналы прочих элементов незначительны. Таким образом, как диагностика плазмы, так и количественный анализ состава сводятся к работе с немногочисленными сигналами основных компонентов. Поэтому в данном случае для диагностики плазмы наиболее предпочтительно одновременное использование атомных и ионных линий (график Саха–Больцмана) для увеличения диапазона энергий верхних уровней, что позволяет получить надёжную оценку температуры плазмы.

2. Исследование временной динамики температуры и электронной плотности лазерно-индуцированной плазмы (ЛИП) биологических материалов различного состава показало, что на ранних временах (задержки менее 1 мкс после лазерного импульса) для разных образцов параметры плазмы близки, однако по мере её разлёта наблюдаются существенные расхождения по значениям температуры и электронной плотности. Это означает, что матричные эффекты менее выражены на ранних временах. При этом для устранения влияния неоднородности образцов при лазерной абляции зоопланктона необходима регистрация большого числа спектров. Моделирование спектров

плазмы в предположении локального термодинамического равновесия позволило выбрать аналитические линии, свободные от самопоглощения и спектральных наложений, для определения лёгких элементов в биологических образцах.

3. В настоящей работе предложена новая метрика для оценки качества результатов (множитель правильности, МП), которая показывает степень отклонения измеренных значений от эталонных и имеет следующие особенности: рассматривается центральная часть распределения (10 % результатов с наибольшими отличиями отбрасывается), что позволяет минимизировать влияние выбросов. МП и стандартное квадратическое отклонение (СКО) дополняют друг друга: СКО характеризует аддитивное отклонение результатов от истинных значений, а МП — мультипликативную ошибку.

4. Анализ источников погрешности при определении соотношений элементов методом ЛИЭС БОС показывает, что наибольший вклад в дисперсию результата (примерно по 40 %) вносят неопределённость температуры и неопределённость интенсивностей рассматриваемой пары эмиссионных линий. Оставшаяся часть погрешности (в среднем 18 %) обусловлена неопределённостью вероятностей соответствующих переходов. Вклад электронной плотности пренебрежимо мал по сравнению с другими слагаемыми. Использование соотношений элемент/углерод и элемент/магний позволило исключить типичное для ЛИЭС БОС распространение неопределённости. Показано, что учёт значений параметров плазмы в разных зонах обеспечивает самые точные результаты (МП = 1.75). Только в варианте ЛИЭС БОС удалось определить литий, для которого построение градуировочной зависимости не представлялось возможным из-за отсутствия подходящих образцов сравнения.

5. Показано, что метод неотрицательного матричного разложения (НМР) может быть успешно применён к матрицам атомно-эмиссионных спектров для нахождения корреляций между сигналами. Сокращение данных путём удаления резонансных линий и неинформативных участков спектров приводит к существенному улучшению характеристик разложений. Применение НМР и МГК к эмиссионным спектрам веслоногих раков показало наличие не менее двух компонент, содержащих сигналы лития. Сигналы лития, по-видимому, слабо коррелируют с сигналами других элементов, за исключением корреляции Li–K, особенно хорошо заметной в результатах НМР. В случае КР в отдельные компоненты выделяются прежде всего сигналы каротиноидов. Наблюдается противопоставление сигналов жирных кислот и аминокислот. Эмиссионные спектры оказались гораздо более чувствительны к таксономическим различиям состава организмов зоопланктона, чем спектры КР (судя по качеству кластеризации образцов). Причиной этого может быть относительно низкая вариабельность и ограниченное количество сигналов КР.

6. В настоящей работе впервые успешно применены алгоритмы хемометрики (HMP, ComDim–МГК, ComDim–АНК, а также силуэтная метрика) для поиска корреляций между сигналами атомной эмиссии и КР. Показано, что сигналы лития присутствуют в главных компонентах совместно с полосами каротиноидов и аминокислот (прежде всего триптофана), а также с линиями калия. В веслоногих раках *Calanoida* простая парная корреляция между концентрацией лития в образце и сигналом триптофана в КР для образцов с умеренным содержанием лития характеризуется наибольшим коэффициентом корреляции для светлого материала, что может говорить о том, что содержание лития связано с составом жировой ткани. Кроме того, наблюдается корреляция лития с сигналом при 640 см^{-1} (тирозин, пролин) и с сигналом при 948 см^{-1} (валин) в тёмном материале. Примечательно, что содержание меди в высших раках *Euphausiacea* также, по-видимому, коррелирует с концентрацией триптофана в тканях светлого цвета. В образцах с наибольшим содержанием лития соотношение сигналов ненасыщенных и насыщенных жирных кислот снижалось пропорционально концентрации лития, что может быть связано с израсходованием запасов жиров.

7. Таким образом, сочетание ЛИЭС и СКР с использованием хемометрических алгоритмов позволяет достаточно полно охарактеризовать скоррелированные изменения в элементном и молекулярном составе тканей животных, что впервые позволило указать на участие ряда аминокислот и пигментов в накоплении микроэлементов организмами зоопланктона. Этот подход может быть использован как удобный и доступный инструмент изучения биохимических процессов. Показана эффективность нескольких алгоритмов хемометрики (HMP, ComDim–МГК, ComDim–АНК, а также силуэтной метрики) для классификации таксонов зоопланктона на основе их спектров.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

К.б.н. Лобусу Николаю Васильевичу (ИО РАН) за предоставление образцов зоопланктона и участие в обсуждении результатов,

к.х.н. Зайцеву Сергею Михайловичу (Химический ф-т МГУ) за результаты моделирования лазерно-индуцированной плазмы и оптимизации экспериментального спектра, а также за помощь при проведении экспериментов,

к.х.н. Попову Андрею Михайловичу (Химический ф-т МГУ) за ценные советы и обсуждения вопросов диагностики плазмы,

сотрудникам Университета г. Сегеда (Венгрия): **Prof. Gábor Galbács, Dr. Krisztián Fintor, Dr. Albert Kéri, Dr. Patrick Janovszky, Ádám Béltéki и Dr. Dávid Palásti** за помощь в регистрации спектров и всестороннюю поддержку,

Emeritus Prof. Douglas N. Rutledge (Национальный музей естественной истории, Париж, Франция) за предоставление программного кода метода ComDim,

сотрудникам и учащимся нашей лаборатории и всем, кто участвовал в настоящем исследовании или содействовал его выполнению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thornton B., Takahashi T., Sato T., Sakka T., Tamura A., Matsumoto A., Nozaki T., Ohki T., Ohki K. Development of a deep-sea laser-induced breakdown spectrometer for in situ multi-element chemical analysis // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2015. V. 95. P. 20–36.
2. Химический анализ в геологии и геохимии / под ред. Аношина Г.Н. Новосибирск: ГЕО, 2016. 620 с.
3. Palleschi V., Legnaioli S., Poggialini F., Bredice F.O., Urbina I.A., Lellouche N., Messaoud Aberkane S. Laser-induced breakdown spectroscopy // *Nature Reviews Methods Primers*. 2025. V. 5. № 1. P. 17.
4. Brereton R.G., Jansen J., Lopes J., Marini F., Pomerantsev A., Rodionova O., Roger J.M., Walczak B., Tauler R. Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017. V. 409. № 25. P. 5891–5899.
5. Campbell L.M., Norstrom R.J., Hobson K.A., Muir D.C.G., Backus S., Fisk A.T. Mercury and other trace elements in a pelagic Arctic marine food web (Northwater Polynya, Baffin Bay) // *Science of The Total Environment*. 2005. V. 351–352. P. 247–263.
6. Анисимов С.И., Лукьянчук Б.С. Избранные задачи теории лазерной абляции // *Успехи физических наук*. 2002. Т. 172. № 3. С. 301–333.
7. Райзер Ю.П. Пробой и нагревание газов под действием лазерного луча // *Успехи физических наук*. 1965. Т. 87. № 1. С. 29–64.
8. Russo R.E., Mao X., Mao S.S. Peer Reviewed: The Physics of Laser Ablation in Microchemical Analysis // *Analytical Chemistry*. 2002. V. 74. № 3. P. 70 A–77 A.
9. Arnold N., Luk'yanchuk B., Bityurin N., Bäuerle D. Nonstationary effects in laser ablation on indium: calculations based on spatial moments technique // *Laser Physics*. 1998. V. 8. № 1. P. 47–55.
10. Luk'yanchuk B., Bityurin N., Arnold N., Bäuerle D. The role of excited species in ultraviolet-laser materials ablation III. Non-stationary ablation of organic polymers // *Applied Physics A*. 1996. V. 62. № 5. P. 397–401.
11. Mao S.S., Mao X., Greif R., Russo R.E. Dynamics of an air breakdown plasma on a solid surface during picosecond laser ablation // *Applied Physics Letters*. 2000. V. 76. № 1. P. 31–33.
12. Russo R.E., Mao X., Liu H., Gonzalez J., Mao S.S. Laser ablation in analytical chemistry—a review // *Talanta*. 2002. V. 57. № 3. P. 425–451.
13. Liu H., Borisov O. V., Mao X., Shuttleworth S., Russo R.E. Pb/U Fractionation during Nd:YAG 213 nm and 266 nm Laser Ablation Sampling with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry // *Applied Spectroscopy*. 2000. V. 54. № 10. P. 1435–1442.
14. Momma C., Nolte S., N. Chichkov B., v. Alvensleben F., Tünnermann A. Precise laser ablation with ultrashort pulses // *Applied Surface Science*. 1997. V. 109–110. P. 15–19.
15. Labutin T.A., Lednev V.N., Ilyin A.A., Popov A.M. Femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2016. V. 31. № 1. P. 90–118.
16. Assion A., Wollenhaupt M., Haag L., Mayorov F., Sarpe-Tudoran C., Winter M., Kutschera U., Baumert T. Femtosecond laser-induced-breakdown spectroscopy for Ca²⁺ analysis of biological samples with high spatial resolution // *Applied Physics B*. 2003. V. 77. № 4. P. 391–397.
17. Margetic V., Pakulev A., Stockhaus A., Bolshov M., Niemax K., Hergenröder R. A comparison of nanosecond and femtosecond laser-induced plasma spectroscopy of brass samples // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2000. V. 55. № 11. P. 1771–1785.
18. Sacchi C.A. Laser-induced electric breakdown in water // *Journal of the Optical Society of America B*. 1991. V. 8. № 2. P. 337–345.
19. Делоне Н.Б. Взаимодействие лазерного излучения с веществом: Курс лекций. Москва: Наука, 1989. 280 с.
20. Vogel A., Nahen K., Theisen D., Noack J. Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd:YAG laser pulses. I. Optical breakdown at threshold and superthreshold irradiance // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 1996. V. 2. № 4. P. 847–860.

21. *Vogel A., Venugopalan V.* Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues // *Chemical Reviews*. 2003. V. 103. № 2. P. 577–644.
22. *Noack J., Hammer D.X., Noojin G.D., Rockwell B.A., Vogel A.* Influence of pulse duration on mechanical effects after laser-induced breakdown in water // *Journal of Applied Physics*. 1998. V. 83. № 12. P. 7488–7495.
23. *Vogel A., Noack J., Nahen K., Theisen D., Busch S., Parlitz U., Hammer D.X., Noojin G.D., Rockwell B.A., Birngruber R.* Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond to femtosecond time scales // *Applied Physics B*. 1999. V. 68. № 2. P. 271–280.
24. *Лохте-Хольтгревен В.* Методы исследования плазмы. Спектроскопия, лазеры, зонды. Москва: Мир, 1971. 552 с.
25. *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications* / ed. by Hill S.J. Blackwell Publishing, 2007. 448 с.
26. *Хьюбер К.-П., Герцберг Г.* Константы двухатомных молекул. Москва: Мир, 1984. 408 с.
27. *Cristoforetti G., De Giacomo A., Dell'Aglio M., Legnaioli S., Tognoni E., Palleschi V., Omenetto N.* Local Thermodynamic Equilibrium in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Beyond the McWhirter criterion // *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2010. V. 65. № 1. P. 86–95.
28. *De Giacomo A., Hermann J.* Laser-induced plasma emission: from atomic to molecular spectra // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2017. V. 50. № 18. P. 183002.
29. *Hermann J.* Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy / *Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)*. Wiley, 2023. P. 89–121.
30. *Zaytsev S.M., Popov A.M., Labutin T.A.* Stationary model of laser-induced plasma: Critical evaluation and applications // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019. V. 158. P. 105632.
31. *Brech F., Cross L.* Optical Microemission Stimulated by a Ruby Laser // *Applied Spectroscopy*. 1962. V. 16. № 16. P. 59–64.
32. *Maiman T.H.* Stimulated Optical Radiation in Ruby // *Nature*. 1960. V. 187. № 4736. P. 493–494.
33. *Креммерс Д., Радziemски Л.* Лазерно-искровая эмиссионная спектроскопия. Москва: Техносфера, 2009. 360 с.
34. *Hahn D.W., Omenetto N.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part I: Review of Basic Diagnostics and Plasma--Particle Interactions: Still-Challenging Issues Within the Analytical Plasma Community // *Appl. Spectrosc.* 2010. V. 64. № 12. P. 335A–366A.
35. *Hahn D.W., Omenetto N.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields // *Appl. Spectrosc.* 2012. V. 66. № 4. P. 347–419.
36. *Зоров Н.Б., Попов А.М., Зайцев С.М., Лабутин Т.А.* Качественный и количественный анализ объектов окружающей среды методом лазерно-искровой эмиссионной спектрометрии // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. С. 1021–1050.
37. *Lednev V., Pershin S.M., Bunkin A.F.* Laser beam profile influence on LIBS analytical capabilities: single vs. multimode beam // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2010. V. 25. № 11. P. 1745–1757.
38. *Зелто О.* Принципы лазеров. СПб: Издательство "Лань", 2008. 720 с.
39. *Galbács G.* A critical review of recent progress in analytical laser-induced breakdown spectroscopy // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. V. 407. № 25. P. 7537–7562.
40. *Demtröder W.* Experimentelle Hilfsmittel des Spektroskopikers // *Laserspektroskopie 1: Grundlagen* / hrsg. von Demtröder W. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. S. 69–157.
41. *Лебедева В.В.* Техника оптической спектроскопии. Москва: Издательство Московского ун-та, 1986. 352 с.
42. *Cremers D.A., Multari R.A., Knight A.K.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy / *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, 2016. P. 1–28.
43. *Noll R.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012. 544 p.

44. *Зайцев С.М.* Анализ стале́й методом лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии с применением термодинамического моделирования спектров плазмы. Дисс. ... канд. хим. наук. Москва: МГУ, 2016. 187 с.
45. *Dussault D., Hoess P.* Noise performance comparison of ICCD with CCD and EMCCD cameras // Proc.SPIE. 2004. V. 5563. P. 195–204.
46. *Зайдель А.Н., Прокофьев В.К., Райский С.М., Славный В.А., Шрейдер Е.Я.* Таблицы спектральных линий. Москва: Наука, 1969. 782 с.
47. *Kramida A., Ralchenko Yu., Reader J., Team N.A.* NIST Atomic Spectra Database (ver. 5.12) [Электронный ресурс]. 2024. URL: <https://physics.nist.gov/asd> (дата обращения: 02.05.2024).
48. *Kurucz R.L., Bell B.* Atomic Line Data, Kurucz CD-ROM No. 23 [Электронный ресурс]. 1995. URL: <https://lweb.cfa.harvard.edu/amp/ampdata/kurucz23/sekur.html> (дата обращения: 02.05.2024).
49. *Yalçın Ş., Crosley D.R., Smith G.P., Faris G.W.* Influence of ambient conditions on the laser air spark // Applied Physics B. 1999. V. 68. № 1. P. 121–130.
50. *Aguilera J.A., Aragón C.* Characterization of a laser-induced plasma by spatially resolved spectroscopy of neutral atom and ion emissions.: Comparison of local and spatially integrated measurements // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2004. V. 59. № 12. P. 1861–1876.
51. *Popov A.M., Akhmetzhanov T.F., Labutin T.A., Zaytsev S.M., Zorov N.B., Chekalin N. V.* Experimental measurements of Stark widths for Mn I lines in long laser spark // Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy. 2016. V. 125. P. 43–51.
52. *Moon H.-Y., Herrera K.K., Omenetto N., Smith B.W., Winefordner J.D.* On the usefulness of a duplicating mirror to evaluate self-absorption effects in laser induced breakdown spectroscopy // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2009. V. 64. № 7. P. 702–713.
53. *Stark J.* Beobachtungen über den Effekt des elektrischen Feldes auf Spektrallinien. I. Quereffekt // Annalen der Physik. 1914. Bd. 348. № 7. S. 965–982.
54. *Gigosos M.A., Cardeñoso V.* New plasma diagnosis tables of hydrogen Stark broadening including ion dynamics // Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. 1996. V. 29. № 20. P. 4795–4838.
55. *Griem H.R.* Spectral Line Broadening by Plasmas. New York and London: Academic Press, 1974. 410 p.
56. *Sahal-Bréchet S., Dimitrijević M.S., Ben Nessib N., Moreau N.* STARK-B Database [Электронный ресурс]. URL: <http://stark-b.obspm.fr/> (дата обращения: 02.05.2025).
57. *Djurović S., Blagojević B., Konjević N.* Experimental and Semiclassical Stark Widths and Shifts for Spectral Lines of Neutral and Ionized Atoms (A Critical Review of Experimental and Semiclassical Data for the Period 2008 Through 2020) // Journal of Physical and Chemical Reference Data. 2023. V. 52. № 3. P. 31503.
58. *Popov A.M., Zaytsev S.M., Seliverstova I. V., Zakuskin A.S., Labutin T.A.* Matrix effects on laser-induced plasma parameters for soils and ores // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2018. V. 148. P. 205–210.
59. *Sushkov N.I.* Qualitative classification of biological materials // Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences / ed. by Galbács G. Cham: Springer Nature, 2022. P. 165–203.
60. *Allmen M. von, Blatter A.* Laser-Beam Interactions with Materials. Berlin–Heidelberg: Springer, 1998. 194 p.
61. *Arakawa E.T., Tuminello P.S., Khare B.N., Milham M.E.* Optical properties of ovalbumin in 0.130–2.50 μm spectral region // Biopolymers. 2001. V. 62. № 2. P. 122–128.
62. *Pauling L.* Die Natur der chemischen Bindung. Weinheim: Verlag Chemie, 1968. 606 S.
63. *Tognoni E., Pallechi V., Corsi M., Cristoforetti G.* Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. 2002. V. 57. № 7. P. 1115–1130.

64. *Jolivet L., Leprince M., Moncayo S., Sorbier L., Lienemann C.-P., Motto-Ros V.* Review of the recent advances and applications of LIBS-based imaging // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019. V. 151. P. 41–53.
65. *Oraevsky A.A., Esenaliev R.O., Letokhov V.S.* Pulsed laser ablation of biological tissue: Review of the mechanisms // *Laser Ablation Mechanisms and Applications* / ed. by Miller J.C., Haglund R.F. New York: Springer, 1991. P. 112–122.
66. *Jagger J.* Introduction to Research in Ultraviolet Photobiology. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1967. 178 p.
67. *Kollias N., Baqer A.H.* The role of human melanin in providing photoprotection from solar mid-ultraviolet radiation (280–320 nm). *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*. 1988. V. 39. № 6. P. 347–354.
68. *Jacques S.L.* Role of tissue optics and pulse duration on tissue effects during high-power laser irradiation // *Applied Optics*. 1993. V. 32. № 13. P. 2447–2454.
69. *Shori R.K., Walston A.A., Stafsuud O.M., Fried D., Walsh J.T.* Quantification and modeling of the dynamic changes in the absorption coefficient of water at $\lambda = 2.94 \mu\text{m}$ // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. 2001. V. 7. № 6. P. 959–970.
70. *Dombi G.W., Haut R.C., Sullivan W.G.* Correlation of High-Speed Tensile Strength with Collagen Content in Control and Lathyrotic Rat Skin // *Journal of Surgical Research*. 1993. V. 54. № 1. P. 21–28.
71. *Paltauf G., Schmidt-Kloiber H.* Model study to investigate the contribution of spallation to pulsed laser ablation of tissue // *Lasers in Surgery and Medicine*. 1995. V. 16. № 3. P. 277–287.
72. *Paltauf G., Schmidt-Kloiber H.* Microcavity dynamics during laser-induced spallation of liquids and gels // *Applied Physics A*. 1996. V. 62. № 4. P. 303–311.
73. *Trokel S.L., Srinivasan R., Braren B.* Excimer Laser Surgery of the Cornea // *American Journal of Ophthalmology*. 1983. V. 96. № 6. P. 710–715.
74. *Oraevsky A.A., Jacques S.L., Pettit G.H., Saidi I.S., Tittel F.K., Henry P.D.* XeCl laser ablation of atherosclerotic aorta: Optical properties and energy pathways // *Lasers in Surgery and Medicine*. 1992. V. 12. № 6. P. 585–597.
75. *Brunco D.P., Thompson M.O., Otis C.E., Goodwin P.M.* Temperature measurements of polyimide during KrF excimer laser ablation // *Journal of Applied Physics*. 1992. V. 72. № 9. P. 4344–4350.
76. *Oraevsky A.A., Jacques S.L., Esenaliev R.O., Tittel F.K.* Pulsed laser ablation of soft tissues, gels, and aqueous solutions at temperatures below 100°C // *Lasers in Surgery and Medicine*. 1996. V. 18. № 3. P. 231–240.
77. *Harilal S.S., Bindhu C. V., Nampoory V.P.N., Vallabhan C.P.G.* Influence of ambient gas on the temperature and density of laser produced carbon plasma // *Applied Physics Letters*. 1998. V. 72. № 2. P. 167–169.
78. *Camacho J.J., Díaz L., Santos M., Reyman D., Poyato J.M.L.* Optical emission spectroscopic study of plasma plumes generated by IR CO₂ pulsed laser on carbon targets // *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2008. V. 41. № 10. P. 105201.
79. *Camacho J.J., Díaz L., Cid J.P., Poyato J.M.L.* Time-resolved spectroscopic diagnostic of the CO₂ plasma induced by a high-power CO₂ pulsed laser // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2011. V. 66. № 9. P. 698–705.
80. *Rusak D.A., Castle B.C., Smith B.W., Winefordner J.D.* Excitational, vibrational, and rotational temperatures in Nd:YAG and XeCl Laser-Induced plasmas // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1997. V. 52. № 13. P. 1929–1935.
81. *Galbács G.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences* / ed. by Galbács G. Cham: Springer Nature, 2022. P. 3–23.
82. *Gamble G.R., Park B., Yoon S.-C., Lawrence K.C.* Effect of Sample Preparation on the Discrimination of Bacterial Isolates Cultured in Liquid Nutrient Media Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) // *Applied Spectroscopy*. 2016. V. 70. № 3. P. 494–504.

83. *Injuk J., Van Grieken R., Blank A., Eksperiandova L., Buhrke V.* Specimen Preparation // Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis / ed. by Beckhoff B., Kanngießer B., Langhoff N., Wedell R., Wolff H. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006. P. 411–432.
84. *Baudelet M., Guyon L., Yu J., Wolf J.-P., Amodeo T., Fréjafon E., Laloi P.* Femtosecond time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy for detection and identification of bacteria: A comparison to the nanosecond regime // *Journal of Applied Physics*. 2006. V. 99. № 8. P. 84701.
85. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Москва: Стандартинформ, 2002.
86. *Piscitelli S V., Martínez L. M.A., Fernández C. A.J., González J.J., Mao X.L., Russo R.E.* Double pulse laser induced breakdown spectroscopy: Experimental study of lead emission intensity dependence on the wavelengths and sample matrix // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2009. V. 64. № 2. P. 147–154.
87. *Chaléard C., Mauchien P., André N., Uebbing J., L. Lacour J., Geertsen C.* Correction of matrix effects in quantitative elemental analysis with laser ablation optical emission spectrometry // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 1997. V. 12. № 2. P. 183–188.
88. *Zorov N.B., Gorbatenko A.A., Labutin T.A., Popov A.M.* A review of normalization techniques in analytical atomic spectrometry with laser sampling: From single to multivariate correction // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010. V. 65. № 8. P. 642–657.
89. *Lazic V., Colao F., Fantoni R., Spizzichino V., Jovićević S.* Underwater sediment analyses by laser induced breakdown spectroscopy and calibration procedure for fluctuating plasma parameters // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007. V. 62. № 1. P. 30–39.
90. *Зоров Н.Б., Попов А.М., Зайцев С.М., Лабутин Т.А.* Качественный и количественный анализ объектов окружающей среды методом лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии // *Успехи химии*. 2015. Т. 84. № 10. С. 1021–1050.
91. *Сушков Н.И., Курьян Н.Н., Анучин С.Н., Зайцев С.М.* Совместное применение лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии и рентгенофлуоресцентной спектроскопии для элементного анализа водных организмов // *Журнал прикладной спектроскопии*. 2023. Т. 90. № 6. P. 917–925.
92. *Labutin T.A., Zaytsev S.M., Popov A.M., Seliverstova I. V., Bozhenko S.E., Zorov N.B.* Comparison of the thermodynamic and correlation criteria for internal standard selection in laser-induced breakdown spectrometry // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013. V. 87. P. 57–64.
93. *Tognoni E., Cristoforetti G.* Basic mechanisms of signal enhancement in ns double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy in a gas environment // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2014. V. 29. № 8. P. 1318–1338.
94. *Babushok V.I., DeLucia F.C., Gottfried J.L., Munson C.A., Miziolek A.W.* Double pulse laser ablation and plasma: Laser induced breakdown spectroscopy signal enhancement // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2006. V. 61. № 9. P. 999–1014.
95. *Scaffidi J., Michael Angel S., Cremers D.A.* Emission Enhancement Mechanisms in Dual-Pulse LIBS // *Analytical Chemistry*. 2006. V. 78. № 1. P. 24–32.
96. *Belkov M. V., Burakov V.S., De Giacomo A., Kiris V. V., Raikov S.N., Tarasenko N. V.* Comparison of two laser-induced breakdown spectroscopy techniques for total carbon measurement in soils // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2009. V. 64. № 9. P. 899–904.
97. *Moenke-Blankenburg L.* Laser microanalysis. New York: Wiley, 1989. 288 p.
98. *Uebbing J., Ciocan A., Niemax K.* Optical emission spectrometry of a microwave induced plasma used with laser ablation of solid samples // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1992. V. 47. № 5. P. 601–610.
99. *Popov A.M., Colao F., Fantoni R.* Enhancement of LIBS signal by spatially confining the laser-induced plasma // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2009. V. 24. № 5. P. 602–604.
100. *Dell'Aglio M., Alrifai R., De Giacomo A.* Nanoparticle Enhanced Laser Induced Breakdown Spectroscopy (NELIBS), a first review // *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2018. V. 148. P. 105–112.

101. *Ohta T., Ito M., Kotani T., Hattori T.* Emission enhancement of laser-induced breakdown spectroscopy by localized surface plasmon resonance for analyzing plant nutrients // *Applied Spectroscopy*. 2009. V. 63. № 5. P. 555–558.
102. *Рылов А.В., Селиверстова И.В., Лабутин Т.А.* Механизм усиления сигнала в лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии при модификации поверхности наночастицами // *Журнал прикладной спектроскопии*. 2023. Т. 90. № 4. С. 541–546.
103. *Zaytsev S.M., Popov A.M., Zorov N.B., Labutin T.A.* Measurement system for high-sensitivity LIBS analysis using ICCD camera in LabVIEW environment // *Journal of Instrumentation*. 2014. V. 9. № 06. P. P06010–P06010.
104. *Parigger C.G., Hornkohl J.O.* Quantum Mechanics of the Diatomic Molecule with Applications. IOP Publishing, 2020. 223 p.
105. *Gaft M., Nagli L., Gorychev A., Raichlin Y.* Rare-earth elements detection using diatomic molecular laser-induced plasma spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2022. V. 192. P. 106426.
106. *Antonov D., Silkis E., Shilo D., Zuev B.* Direct emission spectrometry determination of fluorine in carbon materials: Argon dc arc and spark radiation sources // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023. V. 199. P. 106598.
107. *Gaft M., Nagli L., Gornushkin I., Raichlin Y.* Review on recent advances in analytical applications of molecular emission and modelling // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2020. V. 173. P. 105989.
108. *Лазеева Г.С., Петров А.А., Скворцова Г.В.* О возможности использования оптического квантового генератора для спектрально-изотопного определения газов в металлах // *Вестник ЛГУ*. 1967. Т. 4. P. 63–67.
109. *Петров А.А., Победоносцева Н.А., Скворцова Г.В.* Лазерный факел как источник света в спектрально-изотопном методе // *Журнал прикладной спектроскопии*. 1972. Т. 17. № 3. P. 391–393.
110. *Bol'shakov A.A., Mao X., González J.J., Russo R.E.* Laser ablation molecular isotopic spectrometry (LAMIS): current state of the art // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2016. V. 31. № 1. P. 119–134.
111. *Poggialini F., Legnaioli S., Campanella B., Cocciaro B., Lorenzetti G., Raneri S., Palleschi V.* Calculating the Limits of Detection in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Not as Easy as It Might Seem // *Applied Sciences*. 2023. V. 13. № 6.
112. *Noll R.* Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Its Application Perspectives in Industry and Recycling // *Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)*. 2023. P. 823–850.
113. *McLennan S.M. u др.* Elemental Geochemistry of Sedimentary Rocks at Yellowknife Bay, Gale Crater, Mars // *Science*. 2014. V. 343. № 6169. P. 1244734.
114. *Popov A.M., Drozdova A.N., Zaytsev S.M., Biryukova D.I., Zorov N.B., Labutin T.A.* Rapid, direct determination of strontium in natural waters by laser-induced breakdown spectroscopy // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2016. V. 31. № 5. P. 1123–1130.
115. *De Giacomo A., Dell'Aglio M., Casavola A., Colonna G., De Pascale O., Capitelli M.* Elemental chemical analysis of submerged targets by double-pulse laser-induced breakdown spectroscopy // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2006. V. 385. № 2. P. 303–311.
116. *Ivkovic M., Savovic J., Stankov B.D., Kuzmanovic M., Traparic I.* LIBS depth-profile analysis of W/Cu functionally graded material // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2024. V. 213. P. 106874.
117. *Hou H., Cheng L., Richardson T., Chen G., Doeff M., Zheng R., Russo R., Zorba V.* Three-dimensional elemental imaging of Li-ion solid-state electrolytes using fs-laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2015. V. 30. № 11. P. 2295–2302.
118. *Limbeck A., Brunnbauer L., Lohninger H., Pořizka P., Modlitbová P., Kaiser J., Janovszky P., Kéri A., Galbács G.* Methodology and applications of elemental mapping by laser induced breakdown spectroscopy // *Analytica Chimica Acta*. 2021. V. 1147. P. 72–98.
119. *Motto-Ros V., Moncayo S., Trichard F., Pelascini F.* Investigation of signal extraction in the frame of laser induced breakdown spectroscopy imaging // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019. V. 155. P. 127–133.

120. *Sancey L., Motto-Ros V., Busser B., Kotb S., Benoit J.M., Piednoir A., Lux F., Tillement O., Panczer G., Yu J.* Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues // *Scientific Reports*. 2014. V. 4. № 1. P. 6065.
121. *Gimenez Y., Busser B., Trichard F., Kulesza A., Laurent J.M., Zaun V., Lux F., Benoit J.M., Panczer G., Dugourd P., Tillement O., Pelascini F., Sancey L., Motto-Ros V.* 3D Imaging of Nanoparticle Distribution in Biological Tissue by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 1–9.
122. *Janovszky P., Kéri A., Palásti D.J., Brunnbauer L., Domoki F., Limbeck A., Galbács G.* Quantitative elemental mapping of biological tissues by laser-induced breakdown spectroscopy using matrix recognition // *Scientific Reports*. 2023. V. 13. № 1. P. 10089.
123. *Szebellédy L., Somogyi Z.* Die coulometrische Analyse als Präzisionsmethode. I // *Zeitschrift für analytische Chemie*. 1938. Bd. 112. № 9. S. 313–323.
124. *Грибов Л.А., Баранов В.И., Эляшберг М.Е.* Безэталонный молекулярный спектральный анализ: Теоретические основы. Москва: УРСС, 2020. 320 с.
125. *L'vov B. V.* Electrothermal atomization—the way toward absolute methods of atomic absorption analysis // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1978. V. 33. № 5. P. 153–193.
126. *Criss J.W., Birks L.S.* Calculation methods for fluorescent x-ray spectrometry. Empirical coefficients versus fundamental parameters // *Analytical Chemistry*. 1968. V. 40. № 7. P. 1080–1086.
127. *Hulanicki A.* Absolute methods in analytical chemistry (Technical Report) // *Pure Appl. Chem*. 1995. V. 67. P. 1905–1911.
128. *Ciucci A., Corsi M., Palleschi V., Rastelli S., Salvetti A., Tognoni E.* New Procedure for Quantitative Elemental Analysis by Laser-Induced Plasma Spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. 1999. V. 53. № 8. P. 960–964.
129. *Пуньшев А.А.* Использование термодинамики для описания, изучения и управления термохимическими процессами в источниках атомизации и возбуждения спектров. Дисс. ... доктора хим. наук. Екатеринбург, 1994. 551 с.
130. *Пуньшев А.А., Кель П.В., Бурьлин М.Ю., Абакумов, А.Г. Абакумов П.Г.* Термодинамическое моделирование состава основных фоновых ионов и определение газокинетической температуры в нормальной (“горячей”) индуктивно связанной плазме // *Журнал аналитической химии*. 2024. Т. 79. № 10. С. 1110–1121.
131. *Veiko V.P., Karlagina J., Samokhvalov A., Polyakov D., Manokhin S., Radaev M., Odintsova G., Gornushkin I.* Surface Structuring and Reverse Deposition of Nanoporous Titanium Oxides by Laser Ablation of Titanium in Air // *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2022. V. 42. P. 923–937.
132. *Tognoni E., Cristoforetti G., Legnaioli S., Palleschi V.* Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: State of the art // *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2010. V. 65. № 1. P. 1–14.
133. *Hu Z., Zhang D., Wang W., Chen F., Xu Y., Nie J., Chu Y., Guo L.* A Review of Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022. P. 116618.
134. *Aguilera J.A., Aragón C.* Multi-element Saha–Boltzmann and Boltzmann plots in laser-induced plasmas // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007. V. 62. № 4. P. 378–385.
135. *Gornushkin I.* Calibration-Free Quantitative Analysis // *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences* / ed. by Galbács G. Cham: Springer Nature, 2022. P. 67–99.
136. *Сушков Н.И., Лобус Н.В., Селиверстова И.В., Лабутин Т.А.* Химический анализ зоопланктона методом лазерно-искровой эмиссионной спектроскопии без использования образцов сравнения // *Оптика и спектроскопия*. 2020. Т. 128. № 9. С. 1231–1237.
137. *De Giacomo A., Dell'Aglio M., Gaudiuso R., Santagata A., Senesi G.S., Rossi M., Ghiara M.R., Capitelli F., De Pascale O.* A Laser Induced Breakdown Spectroscopy application based on Local Thermodynamic Equilibrium assumption for the elemental analysis of alexandrite gemstone and copper-based alloys // *Chemical Physics*. 2012. V. 398. P. 233–238.
138. *De Giacomo A., Dell'Aglio M., De Pascale O., Longo S., Capitelli M.* Laser induced breakdown spectroscopy on meteorites // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007. V. 62. № 12. P. 1606–1611.

139. *Bulajic D., Corsi M., Cristoforetti G., Legnaioli S., Palleschi V., Salvetti A., Tognoni E.* A procedure for correcting self-absorption in calibration free-laser induced breakdown spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2002. V. 57. № 2. P. 339–353.
140. *Rezaei F., Cristoforetti G., Tognoni E., Legnaioli S., Palleschi V., Safi A.* A review of the current analytical approaches for evaluating, compensating and exploiting self-absorption in Laser Induced Breakdown Spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2020. V. 169. P. 105878.
141. *Hermann J., Gerhard C., Burger M., Craciun V., Pelascini F.* Progress in calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2023. V. 200. P. 106595.
142. *Pershin S., Lednev V., Bunkin A.* Laser ablation of alloys: Selective evaporation model // *Physics of Wave Phenomena*. 2011. V. 19. P. 261–274.
143. *Hermann J., Grojo D., Axente E., Gerhard C., Burger M., Craciun V.* Ideal radiation source for plasma spectroscopy generated by laser ablation // *Physical Review E*. 2017. V. 96. № 5. P. 53210.
144. *Ma Q., Motto-Ros V., Lei W., Boueri M., Bai X., Zheng L., Zeng H., Yu J.* Temporal and spatial dynamics of laser-induced aluminum plasma in argon background at atmospheric pressure: Interplay with the ambient gas // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010. V. 65. P. 896–907.
145. *Yaroshchuk P., Body D., Morrison R.J.S., Chadwick B.L.* A semi-quantitative standard-less analysis method for laser-induced breakdown spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2006. V. 61. № 2. P. 200–209.
146. *Zaytsev S.M., Krylov I.N., Labutin T.A.* Modelling of emission spectra of homogeneous and inhomogeneous laser plasma for its composition determination // *Modern Methods of Data Analysis: Abstracts of Twelfth Winter Symposium on Chemometrics*. 2020. P. 79–80.
147. *Hermann J., Axente E., Pelascini F., Craciun V.* Analysis of Multi-elemental Thin Films via Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Analytical Chemistry*. 2019. V. 91. № 3. P. 2544–2550.
148. *Gornushkin I.B., Kazakov A.Ya., Omenetto N., Smith B.W., Winefordner J.D.* Experimental verification of a radiative model of laser-induced plasma expanding into vacuum // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2005. V. 60. № 2. P. 215–230.
149. *Gornushkin I., Völker T., Kazakov A.* Extension and investigation by numerical simulations of algorithm for calibration-free laser induced breakdown spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2018. V. 147.
150. *Hansen P.B., Schröder S., Kubitzka S., Rammelkamp K., Vogt D.S., Hübers H.-W.* Modeling of time-resolved LIBS spectra obtained in Martian atmospheric conditions with a stationary plasma approach // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2021. V. 178. P. 106115.
151. *Gornushkin I.B., Kazakov A.Ya., Omenetto N., Smith B.W., Winefordner J.D.* Radiation dynamics of post-breakdown laser induced plasma // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2004. V. 59. № 4. P. 401–418.
152. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy in Biological, Forensic and Materials Sciences / ed. by Galbács G.* Cham: Springer Nature, 2022. 277 p.
153. *De Giacomo A., Dell'Aglio M., De Pascale O., Gaudiuso R., Teghil R., Santagata A., Parisi G.P.* ns- and fs-LIBS of copper-based-alloys: A different approach // *Applied Surface Science*. 2007. V. 253. № 19. P. 7677–7681.
154. *Gaudiuso R., Dell'Aglio M., De Pascale O., Santagata A., De Giacomo A.* Laser-induced plasma analysis of copper alloys based on Local Thermodynamic Equilibrium: An alternative approach to plasma temperature determination and archeometric applications // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2012. V. 74–75. P. 38–45.
155. *Cavalcanti G.H., Teixeira D. V., Legnaioli S., Lorenzetti G., Pardini L., Palleschi V.* One-point calibration for calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy quantitative analysis // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013. V. 87. P. 51–56.
156. *Fu H., Dong F., Wang H., Jia J., Ni Z.* Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (CF-LIBS) with Standard Reference Line for the Analysis of Stainless Steel // *Applied Spectroscopy*. 2017. V. 71. № 8. P. 1982–1989.

157. *Chen C.-T., Banaru D., Sarnet T., Hermann J.* Two-step procedure for trace element analysis in food via calibration-free laser-induced breakdown spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2018. V. 150. P. 77–85.
158. *Aragón C., Aguilera J.A.* Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2008. V. 63. № 9. P. 893–916.
159. *Драбович К.Н.* Большая российская энциклопедия, статья «Комбинационное рассеяние света» [Электронный ресурс]. URL: <https://old.bigenc.ru/physics/text/2622113> (дата обращения: 05.08.2025).
160. *Кнунянц И.Л. (гл. ред.).* Химическая энциклопедия: в 5 т. Москва: Советская энциклопедия, 1990. Т. 2.
161. *Бёккер Ю.* Спектроскопия. Москва: Техносфера, 2009. 528 с.
162. *Пентин Ю.А., Вилков Л.В.* Физические методы исследования в химии. Москва: Мир, ООО "Издательство АСТ", 2003. 683 с.
163. *Tye C.S., Kufcsák A., Ross C.A., Ehrlich K., Henderson R.K., Tanner M.G.* Time-resolved Raman spectroscopy using a CMOS SPAD array to remove fluorescent and fibre Raman backgrounds // *Biomedical Optics Express*. 2025. V. 16. № 7. P. 2824–2834.
164. *Wei D., Chen S., Liu Q.* Review of Fluorescence Suppression Techniques in Raman Spectroscopy // *Applied Spectroscopy Reviews*. 2015. V. 50. № 5. P. 387–406.
165. *Shreve A.P., Cherepy N.J., Mathies R.A.* Effective Rejection of Fluorescence Interference in Raman Spectroscopy Using a Shifted Excitation Difference Technique // *Applied Spectroscopy*. 1992. V. 46. № 4. P. 707–711.
166. *Maiwald M., Schmidt H., Sumpf B., Erbert G., Kronfeldt H.-D., Tränkle G.* Microsystem 671 nm light source for shifted excitation Raman difference spectroscopy // *Applied Optics*. 2009. V. 48. № 15. P. 2789–2792.
167. *Lux A., Conti C., Botteon A., Mosca S., Matousek P.* Shifted-excitation Raman difference spectroscopy and charge-shifting detection coupled with spatially offset Raman spectroscopy for heritage science // *Analyst*. 2025. V. 150. № 6. P. 1140–1150.
168. *Wang T., Dai L.* Background Subtraction of Raman Spectra Based on Iterative Polynomial Smoothing // *Applied Spectroscopy*. 2016. V. 71.
169. *Hu H., Bai J., Xia G., Zhang W., Ma Y.* Improved Baseline Correction Method Based on Polynomial Fitting for Raman Spectroscopy // *Photonic Sensors*. 2018. V. 8. № 4. P. 332–340.
170. *Galloway C.M., Ru E.C. Le, Etchegoin P.G.* An Iterative Algorithm for Background Removal in Spectroscopy by Wavelet Transforms // *Applied Spectroscopy*. 2009. V. 63. № 12. P. 1370–1376.
171. *O'Grady A., Dennis A.C., Denvir D., McGarvey J.J., Bell S.E.J.* Quantitative Raman Spectroscopy of Highly Fluorescent Samples Using Pseudo-second Derivatives and Multivariate Analysis // *Analytical Chemistry*. 2001. V. 73. № 9. P. 2058–2065.
172. *Palacký J., Mojzes P., Bok J.* SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2011. V. 42.
173. *Semenova A.A., Veselova I.A., Brazhe N.A., Shevelkov A. V, Goodilin E.A.* Soft chemistry of pure silver as unique plasmonic metal of the Periodic Table of Elements. *Pure and Applied Chemistry*. 2020. V. 92. № 7. P. 1007–1028.
174. *Krafft C., Dietzek B., Popp J.* Raman and CARS microspectroscopy of cells and tissues // *Analyst*. 2009. V. 134. P. 1046–1057.
175. *Mankova A.A., Nagaeva A.I., Brandt N.N., Chikishev A.Yu.* Cleavage of disulfide bonds used to reveal manifestation of tertiary structure in the Raman spectra of proteins // *Vibrational Spectroscopy*. 2023. V. 128. P. 103564.
176. *Palivec V., Kopecký V., Jungwirth P., Bouř P., Kaminský J., Martinez-Seara H.* Simulation of Raman and Raman optical activity of saccharides in solution // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2020. V. 22. № 4. P. 1983–1993.

177. *Uematsu M., Shimizu T.* Raman microscopy-based quantification of the physical properties of intracellular lipids // *Communications Biology*. 2021. V. 4. № 1. P. 1176.
178. *Kuhar N., Sil S., Verma T., Umapathy S.* Challenges in application of Raman spectroscopy to biology and materials // *RSC Advances*. 2018. V. 8. P. 25888–25908.
179. *Syvilay D., Texier A., Arles A., Gratuze B., Wilkie-Chancellier N., Martinez L., Serfaty S., Detalle V.* Trace element quantification of lead based roof sheets of historical monuments by Laser Induced Breakdown Spectroscopy // *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. 2015. V. 103–104. P. 34–42.
180. *Cristoforetti G., Corsi M., Giuffrida M., Hidalgo M., Iriarte D., Legnaioli S., Palleschi V., Salvetti A., Tognoni E., Boschian G., Mazzoni S.* Micro-LIBS and micro-Raman spectroscopic analysis of ancient pottery // *Laser Induced Plasma Spectroscopy and Applications*. 2002. V. 81. P. FE2.
181. *Ponterio R., Trusso S., Vasi C., La Torre G.F., Toscano Raffa A.* Laser induced breakdown spectroscopy for the analysis of archaeological dyes from Licata (Sicily) // *Radiation Effects and Defects in Solids*. 2008. V. 163. № 4–6. P. 535–543.
182. *Westlake P., Siozos P., Philippidis A., Apostolaki C., Derham B., Terlix A., Perdikatsis V., Jones R., Anglos D.* Studying pigments on painted plaster in Minoan, Roman and Early Byzantine Crete. A multi-analytical technique approach // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 402. № 4. P. 1413–1432.
183. *Marcaida I., Maguregui M., Morillas H., Prieto-Taboada N., Veneranda M., Fdez-Ortiz de Vallejuelo S., Martellone A., De Nigris B., Osanna M., Madariaga J.M.* In situ non-invasive multianalytical methodology to characterize mosaic tesserae from the House of Gilded Cupids, Pompeii // *Heritage Science*. 2019. V. 7. № 1.
184. *Castillejo M., Martín M., Silva D., Stratoudaki T., Anglos D., Burgio L., Clark R.J.H.* Analysis of pigments in polychromes by use of laser induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy // *Journal of Molecular Structure*. 2000. V. 550–551. P. 191–198.
185. *Burgio L., Clark R.J.H., Stratoudaki T., Doulgeridis M., Anglos D.* Pigment Identification in Painted Artworks: A Dual Analytical Approach Employing Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Raman Microscopy // *Applied Spectroscopy*. 2000. V. 54. № 4. P. 463–469.
186. *Melessanaki K., Papadakis V., Balas C., Anglos D.* Laser induced breakdown spectroscopy and hyper-spectral imaging analysis of pigments on an illuminated manuscript // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2001. V. 56. № 12. P. 2337–2346.
187. *Bicchieri M., Nardone M., Russo P.A., Sodo A., Corsi M., Cristoforetti G., Palleschi V., Salvetti A., Tognoni E.* Characterization of azurite and lazurite based pigments by laser induced breakdown spectroscopy and micro-Raman spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2001. V. 56. № 6. P. 915–922.
188. *Burgio L., Melessanaki K., Doulgeridis M., Clark R.J.H., Anglos D.* Pigment identification in paintings employing laser induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2001. V. 56. № 6. P. 905–913.
189. *Castillejo M., Martín M., Oujja M., Silva D., Torres R., Domingo C., García-Ramos J. V., Sánchez-Cortés S.* Spectroscopic Analysis of Pigments and Binding Media of Polychromes by the Combination of Optical Laser-Based and Vibrational Techniques // *Appl. Spectrosc.* 2001. V. 55. № 8. P. 992–998.
190. *Bruder R., Detalle V., Coupry C.* An example of the complementarity of laser-induced breakdown spectroscopy and Raman microscopy for wall painting pigments analysis // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007. V. 38. № 7. P. 909–915.
191. *Fabre C., Boiron M.-C., Dubessy J., Cathelineau M., Banks D.A.* Palaeofluid chemistry of a single fluid event: a bulk and in-situ multi-technique analysis (LIBS, Raman Spectroscopy) of an Alpine fluid (Mont-Blanc) // *Chemical Geology*. 2002. V. 182. № 2. P. 249–264.
192. *Derome D., Cathelineau M., Fabre C., Boiron M.-C., Banks D., Lhomme T., Cuney M.* Paleo-fluid composition determined from individual fluid inclusions by Raman and LIBS: Application to mid-proterozoic evaporitic Na–Ca brines (Alligator Rivers Uranium Field, northern territories Australia) // *Chemical Geology*. 2007. V. 237. № 3. P. 240–254.

193. Gibbons E., Léveillé R., Berlo K. Data fusion of laser-induced breakdown and Raman spectroscopies: Enhancing clay mineral identification // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2020. V. 170. P. 105905.
194. Rammelkamp K., Schröder S., Kubitzka S., Vogt D.S., Frohmann S., Hansen P.B., Böttger U., Hanke F., Hübers H.-W. Low-level LIBS and Raman data fusion in the context of in situ Mars exploration // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2019. V. 51. P. 1–3.
195. Hoehse M., Paul A., Gornushkin I., Panne U. Multivariate classification of pigments and inks using combined Raman spectroscopy and LIBS // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 402. № 4. P. 1443–1450.
196. Hoehse M., Mory D., Florek S., Weritz F., Gornushkin I., Panne U. A combined laser-induced breakdown and Raman spectroscopy Echelle system for elemental and molecular microanalysis // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2009. V. 64. № 11. P. 1219–1227.
197. Hoehse M., Gornushkin I., Merk S., Panne U. Assessment of suitability of diode pumped solid state lasers for laser induced breakdown and Raman spectroscopy // *J. Anal. At. Spectrom.* 2011. V. 26. № 2. P. 414–424.
198. Marquardt B.J., Stratis D.N., Cremers D.A., Angel S.M. Novel Probe for Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Raman Measurements Using an Imaging Optical Fiber // *Applied Spectroscopy*. 1998. V. 52. № 9. P. 1148–1153.
199. Wiens R.C., Cremers D.A., Ferris M., Nordholt J.E., Blacic J.D., Lucey P., Sharma S.K. Development of a prototype LIBS instrument with stand-off Raman capabilities as part of the MIDP // 31st Lunar and Planetary Science Conference (Houston, Texas, USA). 2000. P. 1468.
200. Sharma S.K., Lucey P.G., Ghosh M., Hubble H.W., Horton K.A. Stand-off Raman spectroscopic detection of minerals on planetary surfaces // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2003. V. 59. № 10. P. 2391–2407.
201. Misra A.K., Sharma S.K., Lucey P.G. Methods and apparatus for remote Raman and laser-induced breakdown spectrometry: pat. US8264681B2 USA. 2012.
202. Sharma S.K., Misra A.K., Lucey P.G., Lentz R.C.F. A combined remote Raman and LIBS instrument for characterizing minerals with 532nm laser excitation // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009. T. 73. № 3. P. 468–476.
203. Clegg S.M., Wiens R., Misra A.K., Sharma S.K., Lambert J., Bender S., Newell R., Nowak-Lovato K., Smrekar S., Dyar M.D., Maurice S. Planetary Geochemical Investigations Using Raman and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Applied Spectroscopy*. 2014. V. 68. № 9. P. 925–936.
204. Wiens R.C. *u òp*. The SuperCam Instrument Suite on the NASA Mars 2020 Rover: Body Unit and Combined System Tests // *Space Science Reviews*. 2020. V. 217. № 1. P. 4.
205. Cousin A. *u òp*. The SuperCam Instrument Onboard Perseverance: Overview of efforts compiled for Mars X conference // Tenth International Conference on Mars 2024 (Pasadena, California, USA). 2024. Contribution No. 3007.
206. Bazalgette Courrèges-Lacoste G., Ahlers B., Pérez F.R. Combined Raman spectrometer/laser-induced breakdown spectrometer for the next ESA mission to Mars // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007. V. 68. № 4. P. 1023–1028.
207. Escudero-Sanz I., Ahlers B., Courreges-Lacoste G.B. Optical design of a combined Raman–laser-induced-breakdown-spectroscopy instrument for the European Space Agency ExoMars Mission // *Optical Engineering*. 2008. V. 47. № 3. P. 1–11.
208. Gasda P.J., Acosta-Maeda T.E., Lucey P.G., Misra A.K., Sharma S.K., Taylor G.J. Next Generation Laser-Based Standoff Spectroscopy Techniques for Mars Exploration // *Applied Spectroscopy*. 2015. V. 69. № 2. P. 173–192.
209. Rammelkamp K. Investigation of LIBS and Raman data analysis methods in the context of in-situ planetary exploration. Doktorarbeit. Humboldt-Universität zu Berlin, 2019. 175 p.
210. Ancillotti L., Castellucci E.M., Becucci M. A combined Raman-LIBS spectrometer: toward a mobile atomic and molecular analytical tool for in situ applications // *Proc.SPIE*. 2004. No. 5850.
211. Giakoumaki A., Osticioli I., Anglos D. Spectroscopic analysis using a hybrid LIBS-Raman system // *Applied Physics A*. 2006. V. 83. № 4. P. 537–541.

212. *Osticioli I., Mendes N.F.C., Nevin A., Zoppi A., Lofrumento C., Becucci M., Castellucci E.M.* A new compact instrument for Raman, laser-induced breakdown, and laser-induced fluorescence spectroscopy of works of art and their constituent materials // *Review of Scientific Instruments*. 2009. V. 80. № 7. P. 76109.
213. *Osticioli I., Mendes N.F.C., Porcinai S., Cagnini A., Castellucci E.* Spectroscopic analysis of works of art using a single LIBS and pulsed Raman setup // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009. V. 394. № 4. P. 1033–1041.
214. *Osticioli I., Mendes N.F.C., Nevin A., Gil F.P.S.C., Becucci M., Castellucci E.* Analysis of natural and artificial ultramarine blue pigments using laser induced breakdown and pulsed Raman spectroscopy, statistical analysis and light microscopy // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009. V. 73. № 3. P. 525–531.
215. *Mendes N.F.C., Osticioli I., Striova J., Sansonetti A., Becucci M., Castellucci E.* Versatile pulsed laser setup for depth profiling analysis of multilayered samples in the field of cultural heritage // *Journal of Molecular Structure*. 2009. V. 924–926. P. 420–426.
216. *Dreyer C.B., Mungas G.S., Thanh P., Radziszewski J.G.* Study of sub-mJ-excited laser-induced plasma combined with Raman spectroscopy under Mars atmosphere-simulated conditions // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2007. V. 62. № 12. P. 1448–1459.
217. *Moros J., Lorenzo J.A., Lucena P., Miguel Tobaría L., Laserna J.J.* Simultaneous Raman Spectroscopy–Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Instant Standoff Analysis of Explosives Using a Mobile Integrated Sensor Platform // *Analytical Chemistry*. 2010. V. 82. № 4. P. 1389–1400.
218. *Lednev V.N., Pershin S.M., Sdvizhenskii P.A., Grishin M.Ya., Fedorov A.N., Bukin V. V., Oshurko V.B., Shchegolikhin A.N.* Combining Raman and laser induced breakdown spectroscopy by double pulse lasing // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018. V. 410. № 1. P. 277–286.
219. *Yang J.-H., Jun H.M., Yoh J.J.* Double-pulse laser synchronization aimed at simultaneous detection of enhanced atomic and molecular signals at low pressure conditions // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019. V. 157. P. 12–21.
220. *Moros J., Lorenzo J.A., Laserna J.J.* Standoff detection of explosives: critical comparison for ensuing options on Raman spectroscopy–LIBS sensor fusion // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. V. 400. № 10. P. 3353–3365.
221. *Moros J., Laserna J.J.* New Raman–Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Identity of Explosives Using Parametric Data Fusion on an Integrated Sensing Platform // *Analytical Chemistry*. 2011. V. 83. № 16. P. 6275–6285.
222. *Moros J., Javier Laserna J.* Unveiling the identity of distant targets through advanced Raman-laser-induced breakdown spectroscopy data fusion strategies // *Talanta*. 2015. V. 134. P. 627–639.
223. *Sharma S.K., Misra A.K., Lucey P.G., Wiens R.C., Clegg S.M.* Combined remote LIBS and Raman spectroscopy at 8.6m of sulfur-containing minerals, and minerals coated with hematite or covered with basaltic dust // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007. V. 68. № 4. P. 1036–1045.
224. *Sobron P., Wang A.* A planetary environment and analysis chamber (PEACH) for coordinated Raman–LIBS–IR measurements under planetary surface environmental conditions // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2012. V. 43. № 2. P. 212–227.
225. *Moros J., ElFaham M.M., Laserna J.J.* Dual-Spectroscopy Platform for the Surveillance of Mars Mineralogy Using a Decisions Fusion Architecture on Simultaneous LIBS-Raman Data // *Analytical Chemistry*. 2018. V. 90. № 3. P. 2079–2087.
226. *Choi S.-J., Choi J.-J., Yoh J.J.* Advancing the experimental design for simultaneous acquisition of laser induced plasma and Raman signals using a single pulse // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2016. V. 123. P. 1–5.
227. *Clegg S.M., Wiens R.C., Sharma S.K., Lucey P.G., Misra A.K., Barefield J.* LIBS – Raman Spectroscopy of Minerals Using Remote Surface Modification Techniques // 37th Lunar and Planetary Science Conference (League City, Texas, USA). 2006. P. 2069.
228. *Sharma S.K., Misra A.K., Lucey P.G., Wiens R.C., Clegg S.M.* Combined Remote LIBS and Raman Spectroscopy of Minerals using a Single Laser Source // 38th Lunar and Planetary Science Conference (League City, Texas, USA).. 2007. P. 1208.

229. *Wiens R.C., Sharma S.K., Thompson J., Misra A.* Joint analyses by laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and Raman spectroscopy at stand-off distances // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005. V. 61. № 10. P. 2324–2334.
230. *Glaus R., Hahn D.W.* Fiber-coupled laser-induced breakdown and Raman spectroscopy for flexible sample characterization with depth profiling capabilities // *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy*. 2014. V. 100. P. 116–122.
231. *Matroodi F., Tavassoli S.H.* Experimental investigation on concurrent laser-induced breakdown spectroscopy Raman spectroscopy // *Applied Optics*. 2015. V. 54. № 3. P. 400–407.
232. *Shameem K.M.M., Choudhari K.S., Bankapur A., Kulkarni S.D., Unnikrishnan V.K., George S.D., Kartha V.B., Santhosh C.* A hybrid LIBS–Raman system combined with chemometrics: an efficient tool for plastic identification and sorting // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017. V. 409. № 13. P. 3299–3308.
233. *Martin M.Z., Wullschleger S.D., Garten C.T., Palumbo A. V., Smith J.G.* Elemental Analysis of Environmental and Biological Samples Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Pulsed Raman Spectroscopy // *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2005. V. 25. № 5. P. 687–694.
234. *Lu Y., Li Y., Li Y., Wang Y., Wang S., Bao Z., Zheng R.* Micro spatial analysis of seashell surface using laser-induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2015. V. 110. P. 63–69.
235. *Rehse S.J.* A review of the use of laser-induced breakdown spectroscopy for bacterial classification, quantification, and identification // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2019. V. 154. P. 50–69.
236. *Lednev V.N.* Combining Laser-Induced Breakdown Spectroscopy and Raman Spectroscopy: Instrumentation and Applications // *Laser Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)* / ed. by Singh V.K. et al. Wiley, 2023. P. 487–530.
237. *Родионова О.Е., Померанцев А.Л.* Хемометрика в аналитической химии [Электронный ресурс]. 2006. URL: http://pca.narod.ru/chemometrics_review.pdf (дата обращения: 04.08.2020).
238. *Pearson K.* LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space // *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*. 1901. V. 2. № 11. P. 559–572.
239. *Engel J., Gerretzen J., Szymańska E., Jansen J.J., Downey G., Blanchet L., Buydens L.M.C.* Breaking with trends in pre-processing? // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013. V. 50. P. 96–106.
240. *Prochazka D., Mazura M., Samek O., Rebrošová K., Pořízka P., Klus J., Prochazková P., Novotný J., Novotný K., Kaiser J.* Combination of laser-induced breakdown spectroscopy and Raman spectroscopy for multivariate classification of bacteria // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2018. V. 139. P. 6–12.
241. *Khlaifi A.* Estimation des sources de pollution par modélisation inverse. Thèse présentée pour l'obtention du Doctorat de l'Université Paris XII. 2007. 366 p.
242. *Померанцев А.Л.* Метод главных компонент (PCA) [Электронный ресурс]. 2008. URL: <https://www.chemometrics.ru/old/Tutorials/pca.htm> (дата обращения: 04.08.2020).
243. *Померанцев А.Л.* Хемометрика в Excel: учебное пособие. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2014. 435 с.
244. *Akhmetzhanov T.F., Labutin T.A., Korshunov D.M., Samsonov A.A., Popov A.M.* Determination of Ce and La in REE-rich ores using handheld LIBS and PLS regression // *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2023. V. 38. № 10. P. 2134–2143.
245. *Labutin T.A., Zaytsev S.M., Popov A.M., Zorov N.B.* Carbon determination in carbon-manganese steels under atmospheric conditions by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Optics Express*. 2014. V. 22. № 19. P. 22382–22387.
246. *Aidene S., Khaydukova M., Savinov S., Semenov V., Kirsanov D., Panchuk V.* Partial least squares assisted influence coefficients concept improves accuracy in X-ray fluorescence analysis // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2022. V. 193. P. 106452.
247. *Cichocki A., Zdunek R., Phan A.H., Amari S.* Nonnegative Matrix and Tensor Factorizations: Applications to Exploratory Multi-Way Data Analysis and Blind Source Separation. Wiley, 2009. 477 p.

248. *De Almeida Brehm F., de Azevedo J.C.R., da Costa Pereira J., Burrows H.D.* Direct estimation of dissolved organic carbon using synchronous fluorescence and independent component analysis (ICA): advantages of a multivariate calibration // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015. V. 187. № 11. P. 703.
249. *Monakhova Y.B., Rutledge D.N.* Independent components analysis (ICA) at the “cocktail-party” in analytical chemistry // *Talanta*. 2020. V. 208. P. 120451.
250. *Lee D.D., Seung H.S.* Learning the parts of objects by non-negative matrix factorization // *Nature*. 1999. V. 401. № 6755. P. 788–791.
251. *Blanton M.R., Roweis S.* K-Corrections and Filter Transformations in the Ultraviolet, Optical, and Near-Infrared // *The Astronomical Journal*. 2007. V. 133. № 2. P. 734–754.
252. *Berry M.W., Browne M.* Email Surveillance Using Non-negative Matrix Factorization // *Computational & Mathematical Organization Theory*. 2005. V. 11. № 3. P. 249–264.
253. *Schmidt M.N., Larsen J., Hsiao F.* Wind Noise Reduction using Non-Negative Sparse Coding // 2007 IEEE Workshop on Machine Learning for Signal Processing. 2007. P. 431–436.
254. *Buciu I.* Non-negative matrix factorization, a new tool for feature extraction: theory and applications // *Int. J. of Computers, Communications & Control*. 2008. V. 3. Suppl. issue. P. 67–74.
255. *Xu W., Liu X., Gong Y.* Document Clustering Based on Non-Negative Matrix Factorization // *Proceedings of the 26th Annual International ACM SIGIR Conference on Research and Development in Information Retrieval (Toronto, Canada)*. 2003. P. 267–273.
256. *Brunet J.-P., Tamayo P., Golub T.R., Mesirov J.P.* Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. № 12. P. 4164–4169.
257. *de Juan A., Tauler R.* Multivariate Curve Resolution: 50 years addressing the mixture analysis problem – A review // *Analytica Chimica Acta*. 2021. V. 1145. P. 59–78.
258. *Фок М.В.* Разделение сложных спектров на индивидуальные полосы при помощи обобщенного метода Аленцева // *Труды ФИАН*. 1972. Т. 59. P. 3–24.
259. *Lawton W.H., Sylvestre E.A.* Self Modeling Curve Resolution // *Technometrics*. 1971. V. 13. № 3. P. 617–633.
260. *Hyvärinen A.* Survey on independent component analysis // *Neural computing surveys*. 1999. V. 2. P. 94–128.
261. *Pati R., Pujari A.K., Gahan P., Kumar V.* Independent Component Analysis: A Review, with Emphasis on Commonly used Algorithms and Contrast Function // *Computación y Sistemas*. 2021. V. 25. № 1. P. 97–115.
262. *Westerhuis J.A., Kourti T., MacGregor J.F.* Analysis of multiblock and hierarchical PCA and PLS models // *Journal of Chemometrics*. 1998. V. 12. № 5. P. 301–321.
263. *Qannari E.M., Wakeling I., MacFie H.J.H.* A hierarchy of models for analysing sensory data // *Food Quality and Preference*. 1995. V. 6. № 4. P. 309–314.
264. *Karoui R., Dufour É., De Baerdemaeker J.* Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening // *Analytica Chimica Acta*. 2006. V. 572. № 1. P. 125–133.
265. *Ríos-Reina R., Callejón R.M., Savorani F., Amigo J.M., Cocchi M.* Data fusion approaches in spectroscopic characterization and classification of PDO wine vinegars // *Talanta*. 2019. V. 198. P. 560–572.
266. *Freese D., Niehoff B., Søreide J.E., Sartoris F.J.* Seasonal patterns in extracellular ion concentrations and pH of the Arctic copepod *Calanus glacialis* // *Limnology and Oceanography*. 2015. V. 60. № 6. P. 2121–2129.
267. *Лобус Н.В.* Элементный состав зоопланктона Карского моря и заливов восточного побережья Новой Земли // *Океанология*. 2016. Т. 56. № 6. P. 809–818.
268. *Лобус Н.В., Дриц А.В., Флинт М.В.* Концентрирование химических элементов доминирующими видами копепод в эстуарии р. Обь и на прилежащем шельфе Карского моря // *Океанология*. 2018. Т. 58. № 3. P. 431–442.

269. *Виноградов А.П.* Химический элементарный состав организмов моря / Полное собрание трудов в 18 т. Москва: ГЕОХИ РАН, 2020. Т.1. 768 с.
270. *Sartoris F.J., Thomas D.N., Cornils A., Schiela S.B.S.* Buoyancy and diapause in Antarctic copepods: The role of ammonium accumulation // *Limnology and Oceanography*. 2010. V. 55. № 5. P. 1860–1864.
271. *Скурихин (ред.) И.М., Тутельян (ред.) В.А.* Химический состав российских пищевых продуктов: справочник. Москва: ДеЛи принт, 2002. 236 с.
272. *Nelson W.H., Carey P.R.* Infrared excited resonance Raman spectra of lobster shell pigments in situ // *Journal of Raman Spectroscopy*. 1981. V. 11. № 5. P. 326–328.
273. *Zagalsky P.F.* Invertebrate carotenoproteins // *Methods in Enzymology* / под ред. Law J.H., Rilling H.C. 1985. V. 111. P. 216–247.
274. *De Gelder J., De Gussem K., Vandenabeele P., Moens L.* Reference database of Raman spectra of biological molecules // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2007. V. 38. № 9. P. 1133–1147.
275. *Калашиников П.А. (сост.)*. Таблицы стандартных справочных данных. Морская вода. Шкала практической солености 1978 г. ГСССД, 1984.
276. *Aragon C., Aguilera J.A., Penalba F.* Improvements in Quantitative Analysis of Steel Composition by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy at Atmospheric Pressure Using an Infrared Nd:YAG Laser // *Appl. Spectrosc.* 1999. V. 53. № 10. P. 1259–1267.
277. *Hornkohl J.O., Parigger C., Lewis J.W.L.* Temperature measurements from CN spectra in a laser-induced plasma // *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 1991. V. 46. № 5. P. 405–411.
278. *Очкин В.Н.* Спектроскопия низкотемпературной плазмы. Москва: Физматлит, 2006. 472 с.
279. *Ito H., Ozaki Y., Suzuki K., Kondow T., Kuchitsu K.* Analysis of the $B^2\Sigma^+ \sim A^2\Pi$ perturbations in the CN ($B^2\Sigma^+ - X^2\Sigma^+$) main band system: Electronic structures of $B^2\Sigma^+$ and $A^2\Pi$ // *Journal of Molecular Spectroscopy*. 1988. V. 127. № 1. P. 143–155.
280. *Kotlar A.J., Field R.W., Steinfeld J.I., Coxon J.A.* Analysis of perturbations in the $A^2\Pi - X^2\Sigma^+$ “Red” system of CN // *Journal of Molecular Spectroscopy*. 1980. V. 80. № 1. P. 86–108.
281. *Konjević N., Ivković M., Sakan N.* Hydrogen Balmer lines for low electron number density plasma diagnostics // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2012. V. 76. P. 16–26.
282. *van Regemorter H.* Rate of Collisional Excitation in Stellar Atmospheres. // *The Astrophysical Journal*. 1962. V. 136. P. 906.
283. *Кизеветтер И.В.* Биохимия сырья водного происхождения. Москва, Пищевая промышленность, 1973. 424 с.
284. ИВТАНТЕРМО [Электронный ресурс]. URL: <https://thermo.jiht.ru/ru/> (дата обращения: 19.06.2024).
285. *Aragón C., Aguilera J.A.* Determination of the local electron number density in laser-induced plasmas by Stark-broadened profiles of spectral lines: Comparative results from H α , Fe I and Si II lines // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010. V. 65. № 5. P. 395–400.
286. *Sushkov N.I., Labutin T.A.* Laser-induced breakdown spectroscopy of biological tissues: Plasma diagnostics and a comparison of quantification approaches // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2024. V. 211. P. 106834.
287. ГОСТ ISO 13528-2024. Статистические методы. Применение при проверке квалификации посредством межлабораторного сличения. Москва: Российский институт стандартизации, 2025.
288. *Marali S., Schöne B.R., Mertz-Kraus R., Griffin S.M., Wanamaker A.D., Butler P.G., Holland H.A., Jochum K.P.* Reproducibility of trace element time-series (Na/Ca, Mg/Ca, Mn/Ca, Sr/Ca, and Ba/Ca) within and between specimens of the bivalve *Arctica islandica* – A LA-ICP-MS line scan study // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 2017. V. 484. P. 109–128.
289. *Akhmetzhanov T.F., Labutin T.A., Zaytsev S.M., Drozdova A.N., Popov A.M.* Determination of the Mn/Fe Ratio in Ferromanganese Nodules Using Calibration-Free Laser-Induced Breakdown Spectroscopy // *Optics and Spectroscopy*. 2019. V. 126. № 4. P. 316–320.
290. Количественный химический анализ почв. Методика измерений массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения

- спектральными методами: ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере природопользования, 2011. 45 с.
291. *Лобус Н.В.* Элементный состав зоопланктона Карского моря и заливов восточного побережья Новой Земли // *Океанология*. 2016. Т. 56. № 6. С. 809–818.
 292. *Sushkov N.I., Galbács G., Janovszky P., Lobus N. V, Labutin T.A.* Towards Automated Classification of Zooplankton Using Combination of Laser Spectral Techniques and Advanced Chemometrics // *Sensors*. 2022. V. 22. № 21.
 293. *Pearse R.W.B., Gaydon A.G.* The Identification of Molecular Spectra. London: Chapman & Hall, 1963. 347 p.
 294. *Lin-Vien D., Colthup N.B., Fateley W.G., Grasselli J.G.* The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules. Academic Press, 1991. 503 p.
 295. *Sushkov N.I., Galbács G., Fintor K., Lobus N. V, Labutin T.A.* A novel approach for discovering correlations between elemental and molecular composition using laser-based spectroscopic techniques // *Analyst*. 2022. V. 147. P. 3248–3257.
 296. *Лобус Н.В., Дриц А.В., Флинт М.В.* Концентрирование химических элементов доминирующими видами копепод в эстуарии реки Обь и на прилегающем шельфе Карского моря // *Океанология*. 2018. Т. 58. № 3. С. 431–442.
 297. *Lobus N. V., Arashkevich E.G., Flerova E.A.* Major, trace, and rare-earth elements in the zooplankton of the Laptev Sea in relation to community composition // *Environmental Science and Pollution Research*. 2019. V. 26. № 22. P. 23044–23060.
 298. *Kaufman L., Rousseeuw P.J.* Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis. Wiley, 2008. 342 p.
 299. *Mishra P., Roger J.M., Jouan-Rimbaud-Bouveresse D., Biancolillo A., Marini F., Nordon A., Rutledge D.N.* Recent trends in multi-block data analysis in chemometrics for multi-source data integration // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2021. V. 137. P. 116206.
 300. *Breitwieser M., Vigneau E., Viricel A., Becquet V., Lacroix C., Erb M., Huet V., Churlaud C., Le Floch S., Guillot B., Graber M., Thomas H.* What is the relationship between the bioaccumulation of chemical contaminants in the variegated scallop *Mimachlamys varia* and its health status? A study carried out on the French Atlantic coast using the Path ComDim model // *Science of The Total Environment*. 2018. V. 640–641. P. 662–670.
 301. *Timmer R.T., Sands J.M.* Lithium Intoxication // *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999. V. 10. № 3.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Результаты анализа зоопланктона методами ИСП-АЭС и ИСП-МС (предоставлены ИО РАН).

Образец	Al, мкг/г	B, мкг/г	Ca, %	Cu, мкг/г	Fe, мкг/г	K, %	Li, мкг/г	Mg, %	Na, %	P, %	Sr, мкг/г	Zn, мкг/г
1	4.19	1.90	0.040	3.41	30.3	0.796	231	0.082	0.785	0.607	6.60	58.0
2	68.0	3.89	0.081	6.78	246	0.779	345	0.131	1.38	0.730	19.0	165
3	737	11.1	1.56	58.34	446	1.24	1.5	0.329	1.35	1.34	182	125
4	23.3	1.25	0.022	3.79	44.4	0.719	68.4	0.056	0.471	0.585	3.54	76.5
5	351.3	2.86	0.064	3.84	338	0.356	0.92	0.099	0.962	0.478	11.9	75.9
6	163.4	0.00	1.18	19.70	172	1.17	0.30	0.141	0.616	0.951	187	61.5
7	16.7	5.93	0.647	33.43	33.1	1.15	0.34	0.234	1.58	1.20	105	68.1
8	59.4	13.1	1.94	5.18	227	1.64	0.63	0.326	2.27	0.952	69.7	136
9	381.3	3.26	1.81	33.77	218	1.32	0.53	0.205	1.15	1.05	290	75.2
10	138.3	10.6	0.168	7.90	200	0.509	51.4	0.208	1.78	0.838	25.0	123
11	360.3	4.59	0.815	37.99	171	0.856	1.7	0.200	1.34	1.28	130	102
12	179.1	3.32	1.11	45.11	81.6	1.20	4.0	0.296	0.912	0.999	178	48.9
13	163.4	0.00	1.18	19.70	172	1.17	0.30	0.141	0.616	0.951	187	61.5
14	118.1	4.13	0.814	42.01	71.9	0.964	0.44	0.213	1.46	1.27	134	60.4
15	516.7	4.49	1.68	33.46	340	1.09	1.5	0.222	0.989	1.07	272	67.2
16	25.4	2.00	0.043	6.02	56.7	0.682	66.3	0.111	0.720	0.633	11.7	157
17	43.0	3.52	0.071	5.44	133	1.14	716	0.144	1.29	0.911	13.7	99.6
18	138	10.6	0.168	7.90	200	0.509	51.4	0.208	1.78	0.838	25.0	123
19	57.1	2.48	0.027	3.67	107	0.658	21.3	0.082	0.409	0.553	4.72	75.0
20	73.5	0.444	0.030	7.96	93.2	0.799	0.19	0.067	0.469	0.683	5.58	96.8
21	38.4	1.62	0.103	9.42	115	0.857	39.5	0.112	0.790	0.694	16.2	125
22	57.9	0.750	0.094	5.78	173	0.0087	0.93	0.018	1.97	0.146	10.8	215
23	17.2	2.17	0.084	11.08	102	0.904	43.1	0.118	0.991	0.675	12.4	124
24	55.3	11.5	0.230	6.58	127	0.884	29.7	0.392	3.12	0.689	32.1	118
25	56.7	13.1	0.296	6.03	204	0.514	6.7	0.425	2.92	0.593	48.1	303
26	6.70	13.4	0.079	3.79	0.00	0.666	2.2	0.223	1.28	0.889	12.0	132
27	6.75	23.0	0.094	5.47	14.4	1.41	2.2	0.372	2.81	0.962	17.4	175

Образец	Al, мкг/г	B, мкг/г	Ca, %	Cu, мкг/г	Fe, мкг/г	K, %	Li, мкг/г	Mg, %	Na, %	P, %	Sr, мкг/г	Zn, мкг/г
28 (з. Седова)	737	11.1	1.56	58.34	446	1.24	1.5	0.329	1.35	1.34	182	125
29 (АТ-71)	95.9	14.7	0.270	10.31	124	1.37	475	0.449	4.36	0.863	150	147
30 («№ 5»)	18.9	3.53	0.048	5.28	47.5	0.641	135	0.164	1.17	0.674	11.1	195
31 («№ 5225»)	13.2	2.70	0.054	5.22	47.9	0.700	94.0	0.091	0.742	0.542	7.0	86.3

Примечание. Содержание общего углерода в образцах №№ 28–31 составляет 49.48, 35.95, 54.52 и 57.95 %, соответственно.

Приложение 2. Полный список аналитических линий.

Частица	λ , нм	gA/10 ⁸	Класс*	E _{возб.} , эВ	E _{ион1.} , эВ	E _{ион2.} , эВ	Частица	λ , нм	gA/10 ⁸	Класс*	E _{возб.} , эВ	E _{ион1.} , эВ	E _{ион2.} , эВ
B I	249.677	1.68	A				P I	214.914	6.36	C	7.176		
B I	249.772	3.36	A	4.964	8.298	25.155	P I	215.294	1.94	C	8.078		
C I	247.856	0.840	C+	7.685	11.260	24.383	P I	215.408	3.50	C	8.078		
Ca I	612.222	0.861	C	3.910			P I	215.411	0.692	C	8.078	10.487	19.769
Ca I	429.899	1.40	C+	4.769			P I	253.399	0.80	C	7.213		
Ca I	430.253	6.80	C+	4.780			P I	253.561	3.80	C	7.213		
Ca I	422.673	6.54	B+	2.933	6.113	11.872	P I	255.326	1.40	C	7.176		
Ca II	396.847	2.8	C	3.123			P I	255.491	0.60	C	7.176		
Ca II	315.887	12	C	7.047			Si I	243.515	2.22	B	5.871		
Ca II	373.690	3.40	C	6.468			Si I	250.690	2.74	B	4.954		
H I	656.279	7.94	AAA	12.088	13.598	–	Si I	251.432	2.22	B	4.930		
K I	404.414	0.0464	A	3.065	4.341	31.625	Si I	251.611	8.40	B	4.954		
Li I	610.354	2.29	AAA	3.879			Si I	251.920	1.65	B	4.930	8.152	16.346
Li I	670.776	1.48	AAA	1.848	5.392	75.640	Si I	252.411	2.22	B	4.920		
Mg I	517.268	1.01	B+	5.108			Si I	252.851	2.71	B	4.930		
Mg I	383.230	6.05	B+	5.946			Si I	263.128	3.18	B	6.619		
Mg I	277.983	20.4	B	7.175	7.646	15.035	Si I	212.412	20.8	B	6.616		
Mg I	285.213	14.7	A	4.346			Si I	390.552	0.399	B	5.082		
Na I	330.237	0.11	A	3.753	5.139	47.286	Sr I	460.733	6.03	AA	2.690	5.695	11.030
P I	213.618	11.3	C	7.213	10.487	19.769	Sr II	407.771	5.64	AA	3.040		

*Класс погрешности коэффициента Эйнштейна согласно классификации NIST (AA: $\leq 1\%$; A+: $\leq 2\%$; A: $\leq 3\%$; B+: $\leq 7\%$; B: $\leq 10\%$; C+: $\leq 18\%$; C: $\leq 25\%$).

Приложение 3. Результаты количественного анализа биологических образцов методом ЛИЭС.

Приведены концентрации и их доверительные интервалы уровня 95 %.
Расчёты выполнены по соотношению элемент/углерод, если не указано иное.

Элемент, единицы	АТ-71				Седов				IAEA-407**			Бок-2		
	Град	БОС1	БОС2	ИСП- АЭС/МС	Град	БОС1	БОС2	ИСП- АЭС/МС	БОС1	БОС2	Паспорт	БОС1	БОС2	Паспорт
В, мкг/г	12.1±0.4	20.4±1.6	31±17	14.7±3.6	2.1±0.2	19±2	29±16	11±3	н/д	н/д	н/к	н/д	н/д	н/к
Са, %	0.28±0.04	0.135±0.003	0.4±0.3	0.27±0.06	2.15±0.29	1.69±0.14	1.2±0.8	1.56±0.28	1.6±0.2	1.8±1.5	2.70±0.13	0.10±0.02	н/д	0.17±0.03
К, %	1.5±0.05	1.3±0.2	2.3±1.4	1.37±0.36	1.1±0.2	2.8±0.5	4.1±1.0	1.2±0.3	н/д	н/д	1.31±0.09	3.0±0.9	3.1±1.4	1.55±0.08
Li, мкг/г	—*	476±26	550±270	480±140	2.2±0.3†	н/д	н/д	1.5±0.5	н/д	н/д	0.685±0.065	н/д	н/д	н/к
Mg, %	0.8±0.2	0.32±0.03	0.6±0.4	0.45±0.09	0.30±0.05	0.39±0.02	0.34±0.13	0.33±0.07	**	**	**	0.15±0.01	0.17±0.10	0.103±0.012
Na, %	0.35±0.07	1.1±0.2	1.8±1.5	4.4±1.7	1.42±0.14	1.88±0.16	1.5±0.9	1.35±0.51	2.1±0.2	2.5±2.2	1.31±0.06	3.1±0.4	0.35±0.26	0.28±0.01
P, %	0.73±0.05	0.59±0.02	0.9±0.4	0.86±0.26	3.4±0.2*	2.44±0.17	1.8±0.5	1.3±0.4	2.55±0.79	3.4±2.5	1.8±0.5††	1.6±0.2	0.9±0.7	0.95±0.05
Sr, мкг/г	51±8	15±6	44±29	150±40	180±6	168±12	120±67	182±47	67±7	83±48	130±5	1.0±0.1	5±3	2.8±0.3

Погрешности результатов ИСП–АЭС/МС оценены в соответствии с ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 [290].

Н/к = Не аттестовано в стандартном образце или не измерено независимым методом.

Н/д = Расчётная концентрация меньше соответствующего доверительного интервала (если не указано иное).

†Измерение выполнено по линии Li I при 670.78 нм.

†† Стандартный образец не аттестован по фосфору, его содержание измерено методом ИСП–АЭС.

*Измеряемая концентрация выходит за пределы градуировки. **Расчёт выполнен по соотношениям элемент/магний.

Приложение 4. Результаты разложений данных методами хемометрики.

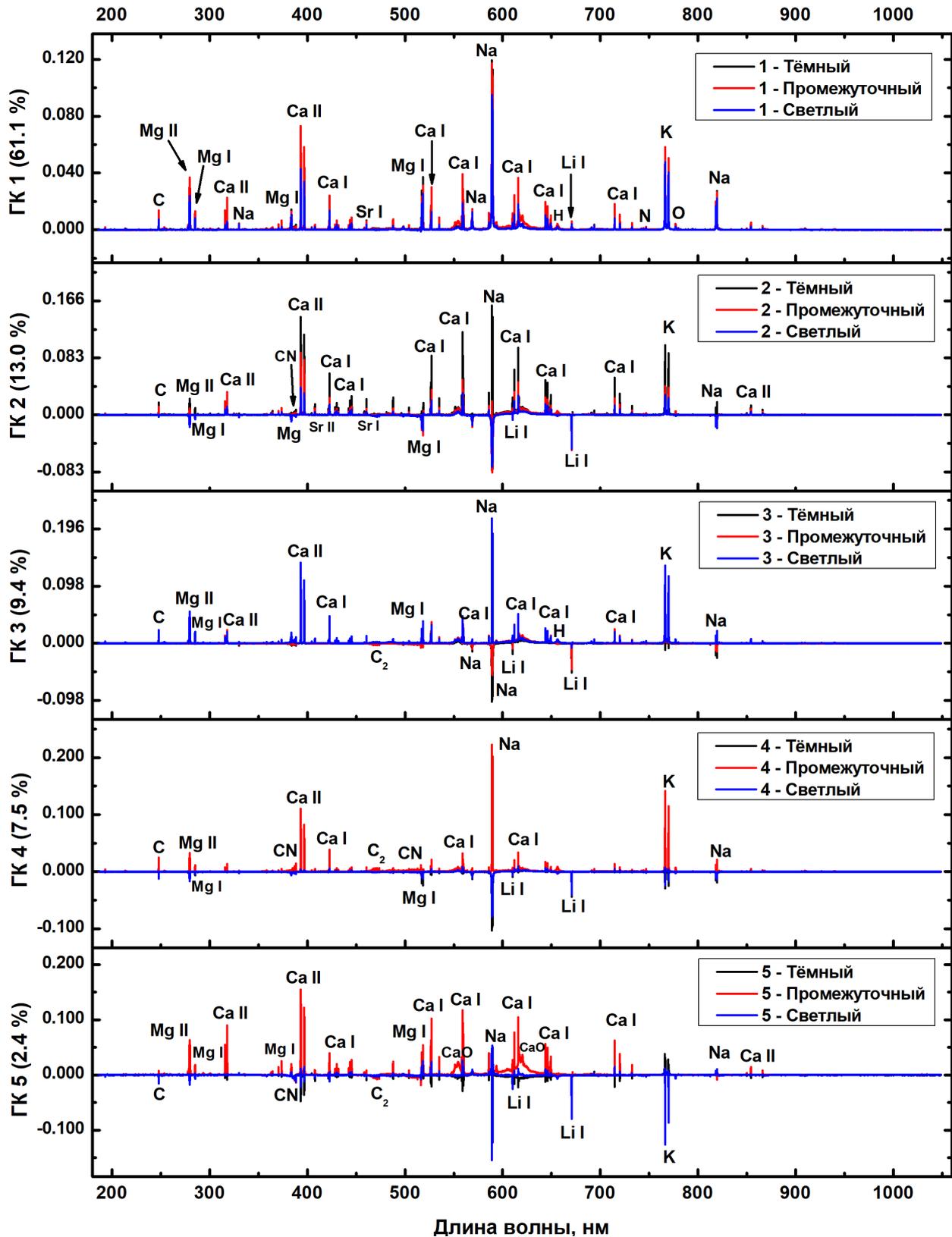


Рисунок П1. Нагрузки МГК для эмиссионных спектров (29 образцов, спектры без сокращений). Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы.

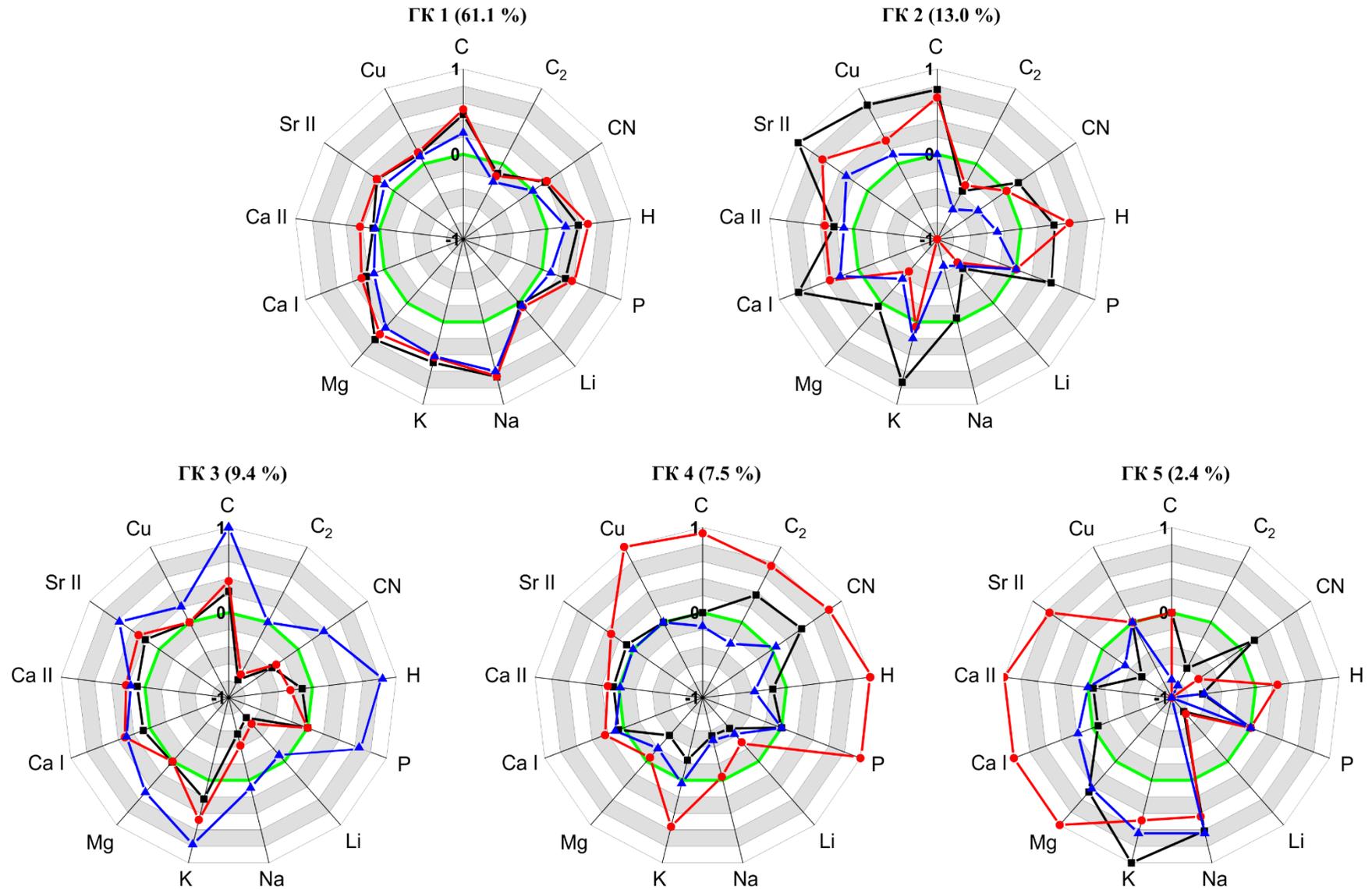


Рисунок П2. Разложение эмиссионных спектров методом ГК (29 образцов, спектры без сокращений).

Показаны интегралы избранных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

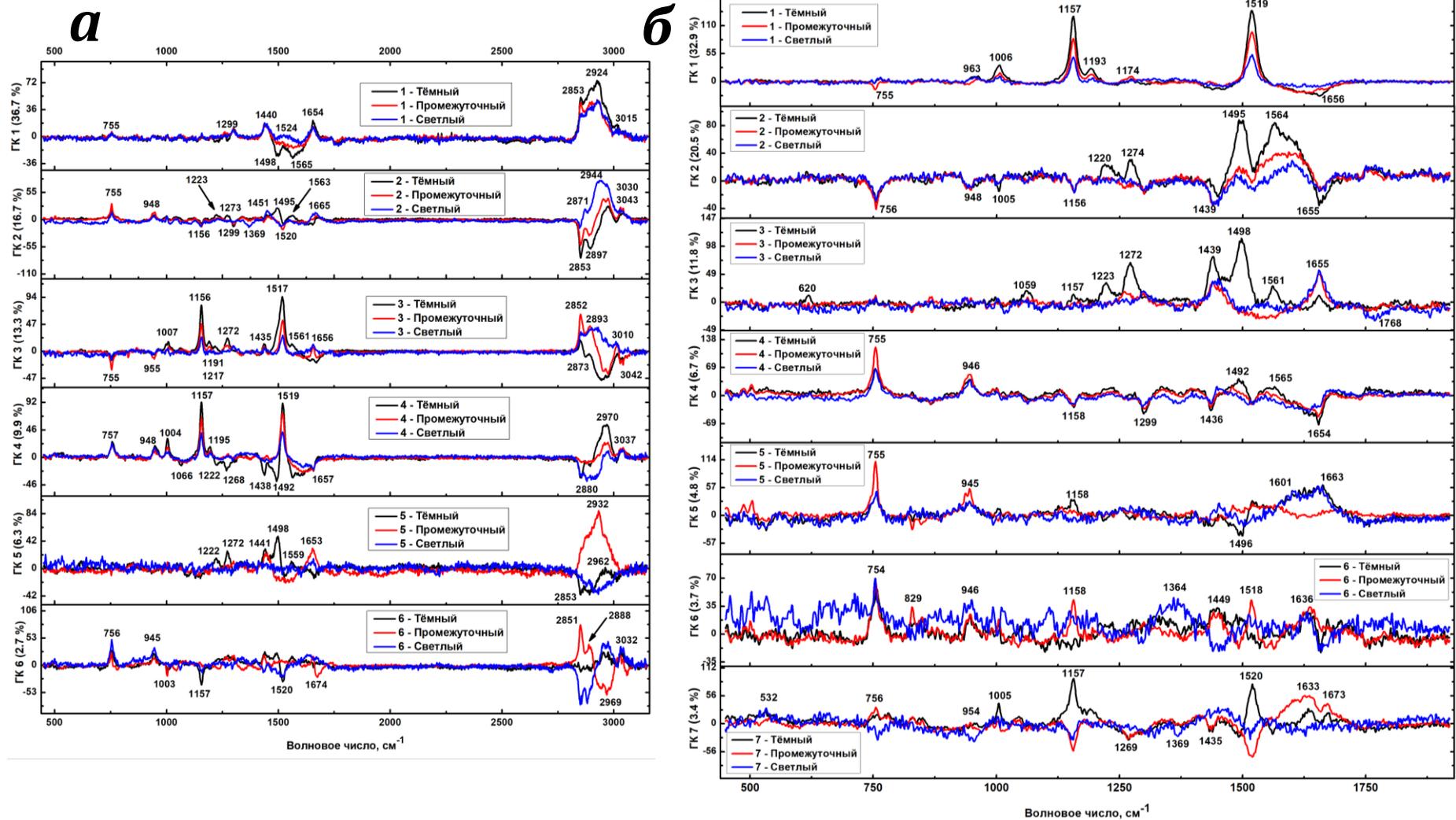


Рисунок ПЗ. Нагрузки МГК для спектров КР (29 образцов): а) исходные данные без сокращений (449 – 3151 см⁻¹);

б) результаты для сокращённых данных (449 – 1921 см⁻¹).

Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы.

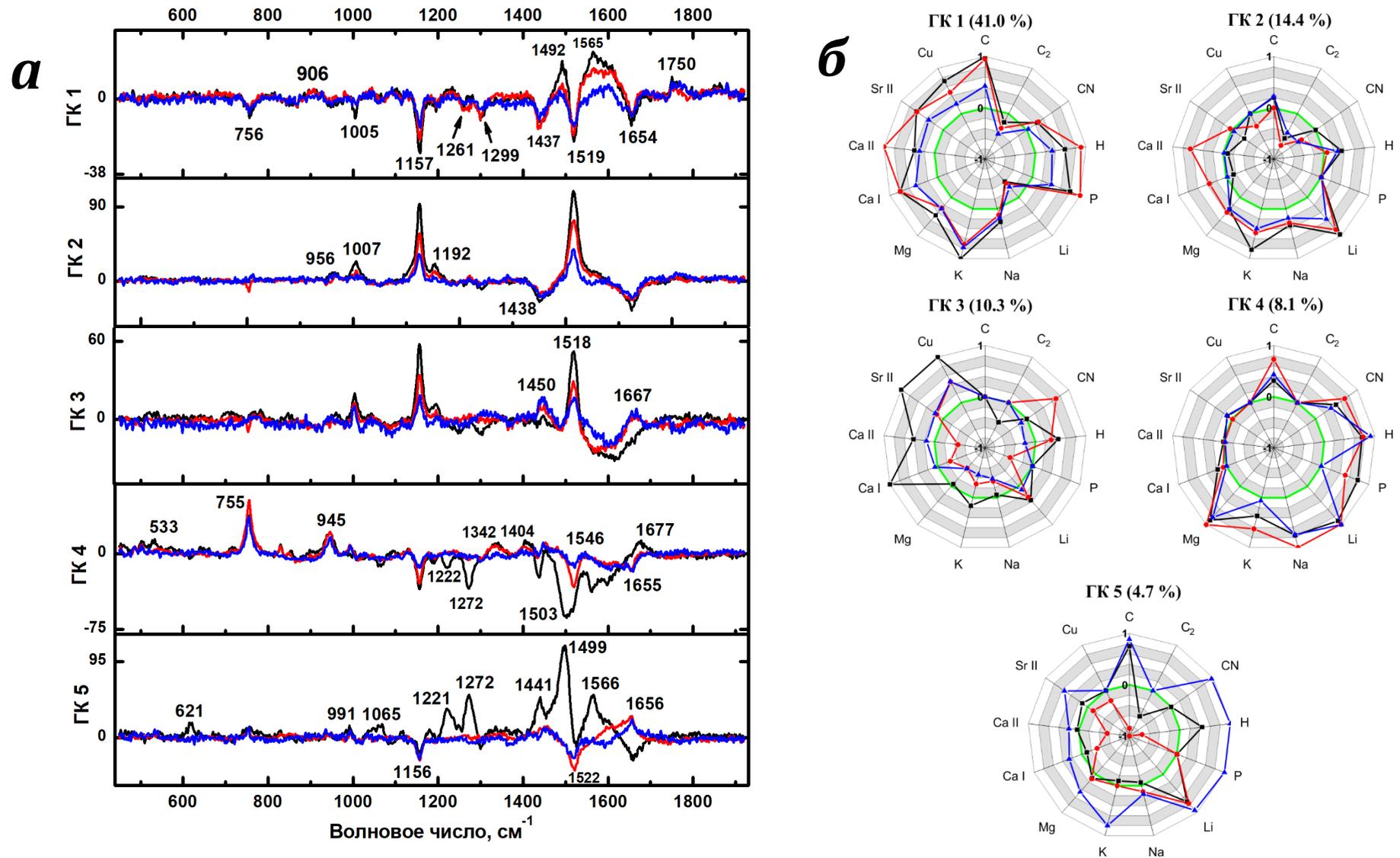


Рисунок П4. Результаты МГК для объединённых спектров ЛИП и КР (см. стр. 112): *а*) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; *б*) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

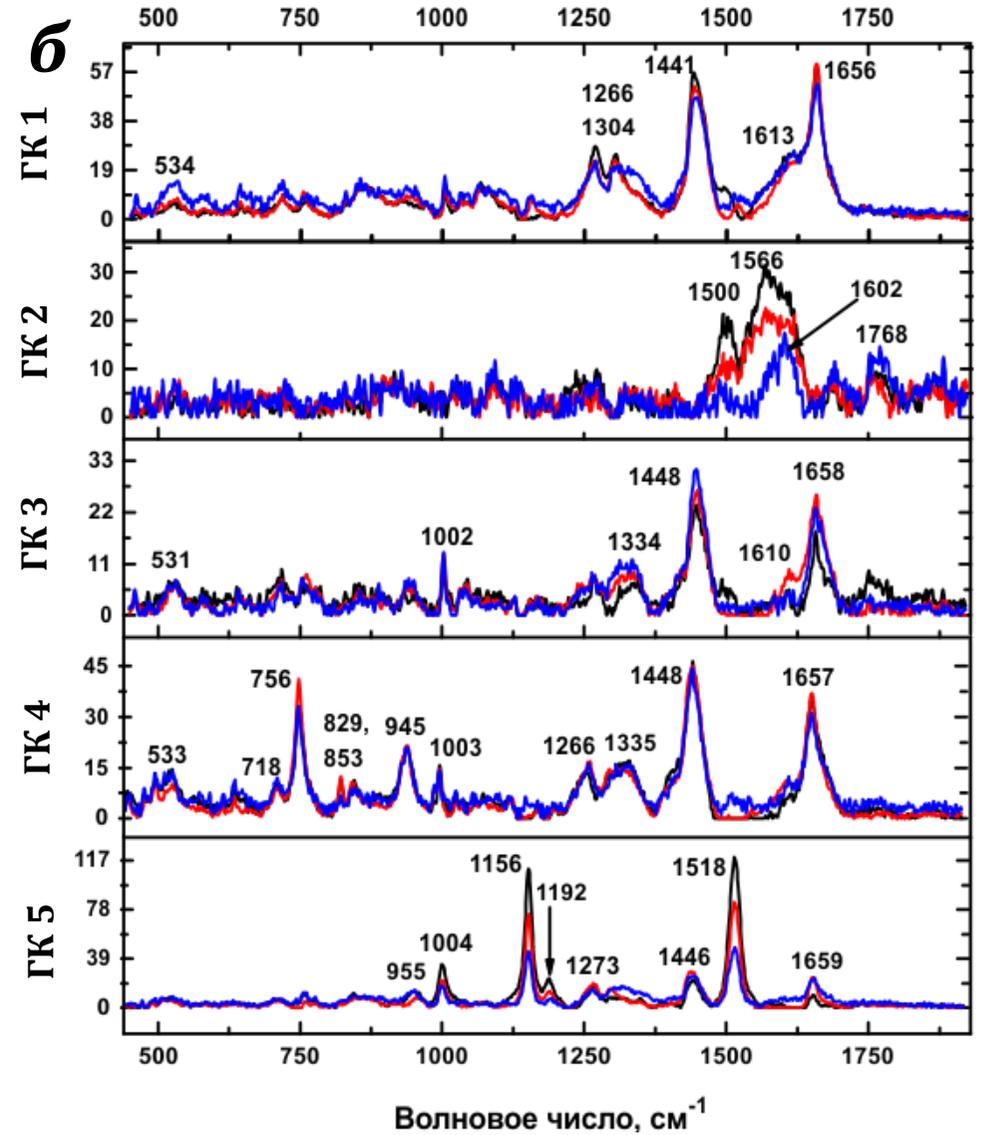
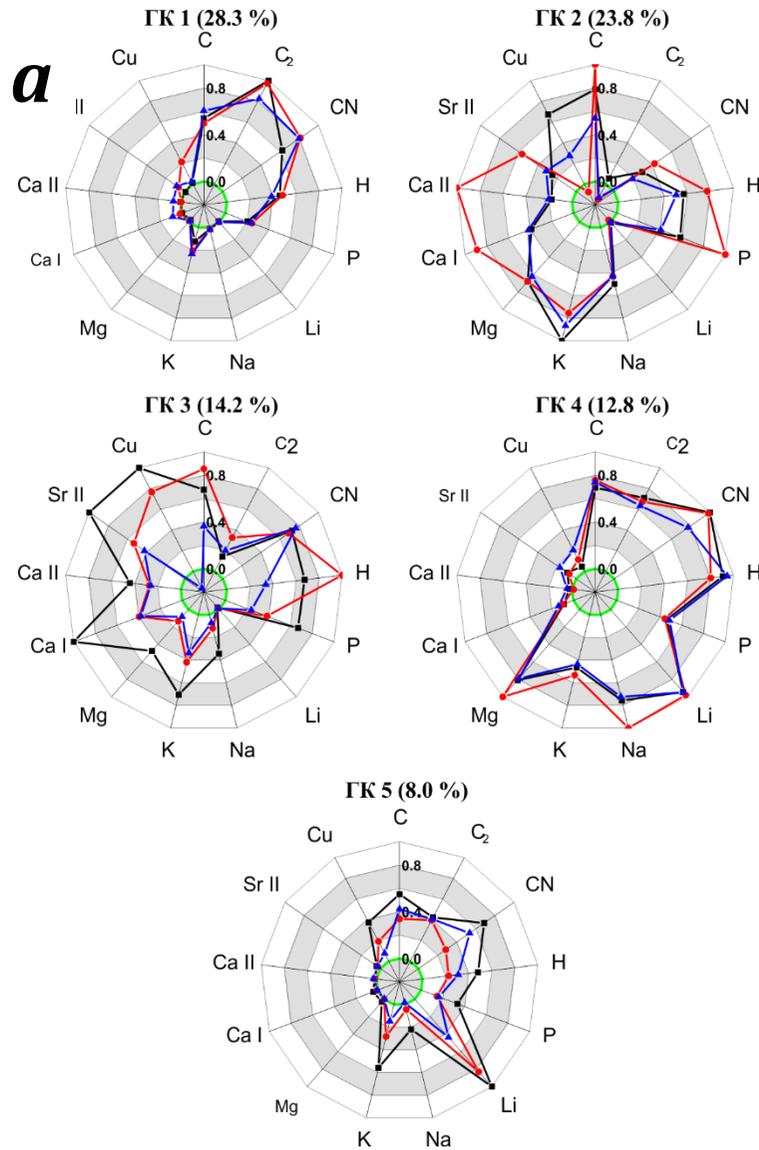


Рисунок П5. Результаты НМР для объединённых спектров ЛИП и КР (см. стр. 112): а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

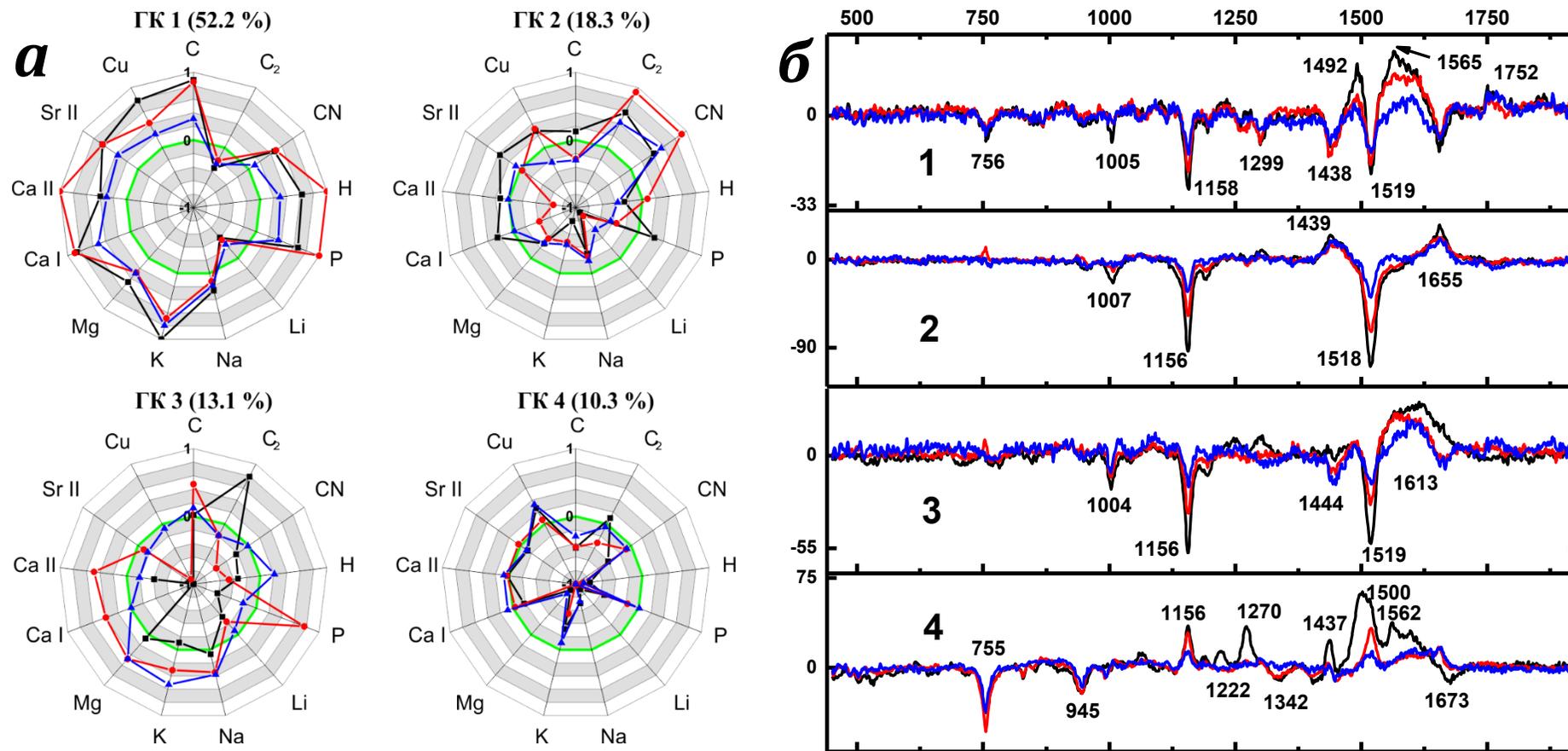


Рисунок П6. Результаты консенсусного МГК для объединённых спектров ЛИП и КР: а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

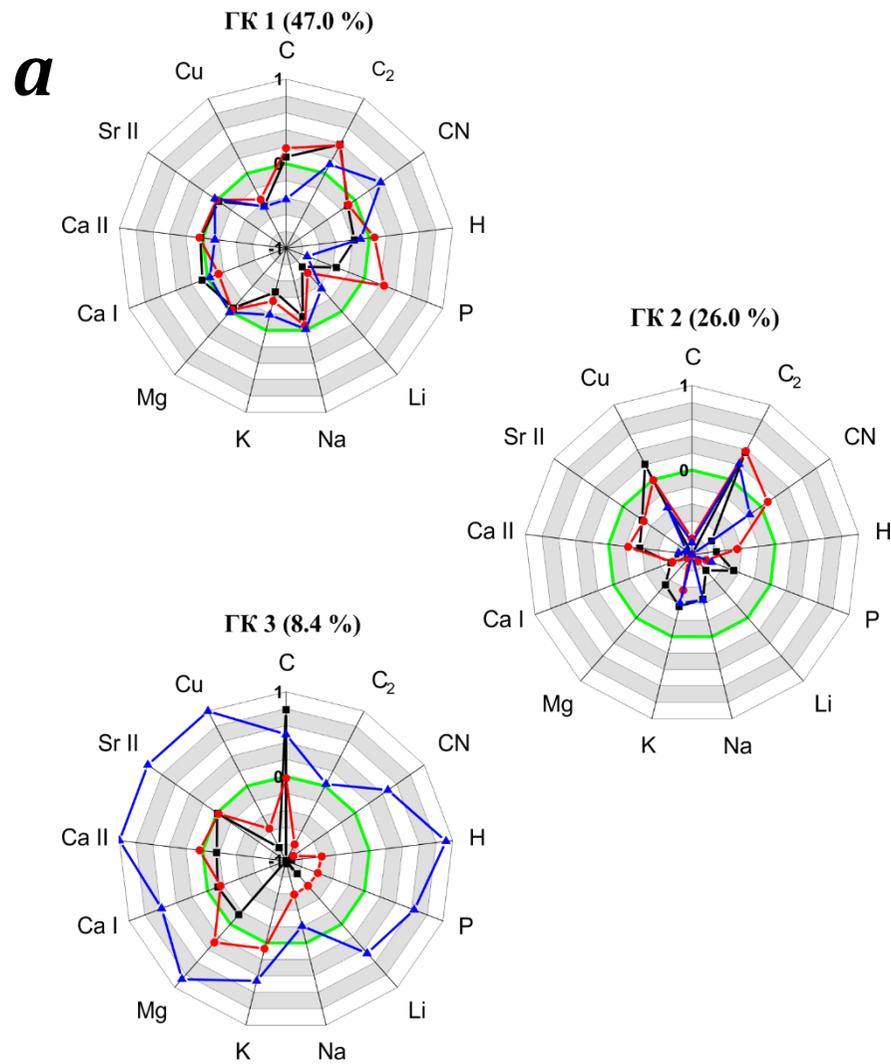
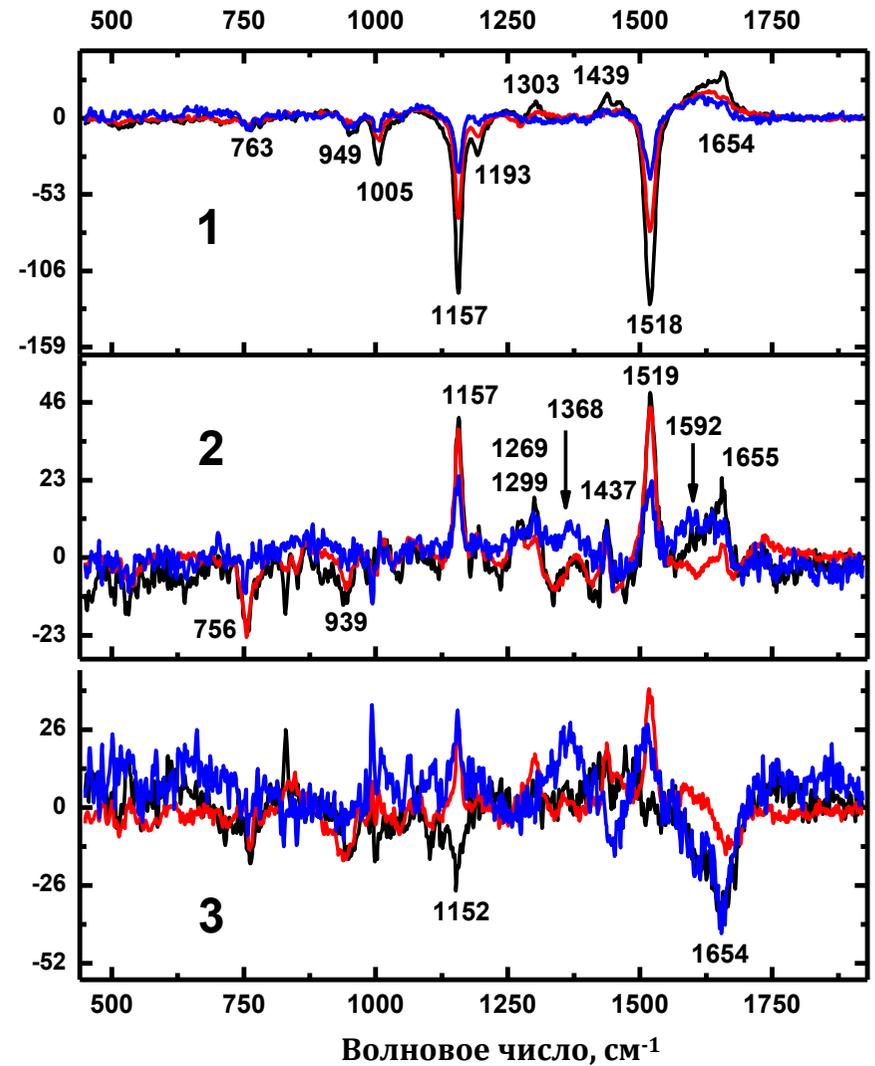
**b**

Рисунок П7. Результаты консенсусного МГК для объединённых спектров ЛИП и КР (поднабор *Calanoida*, 14 образцов): *a*) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; *b*) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

б

а

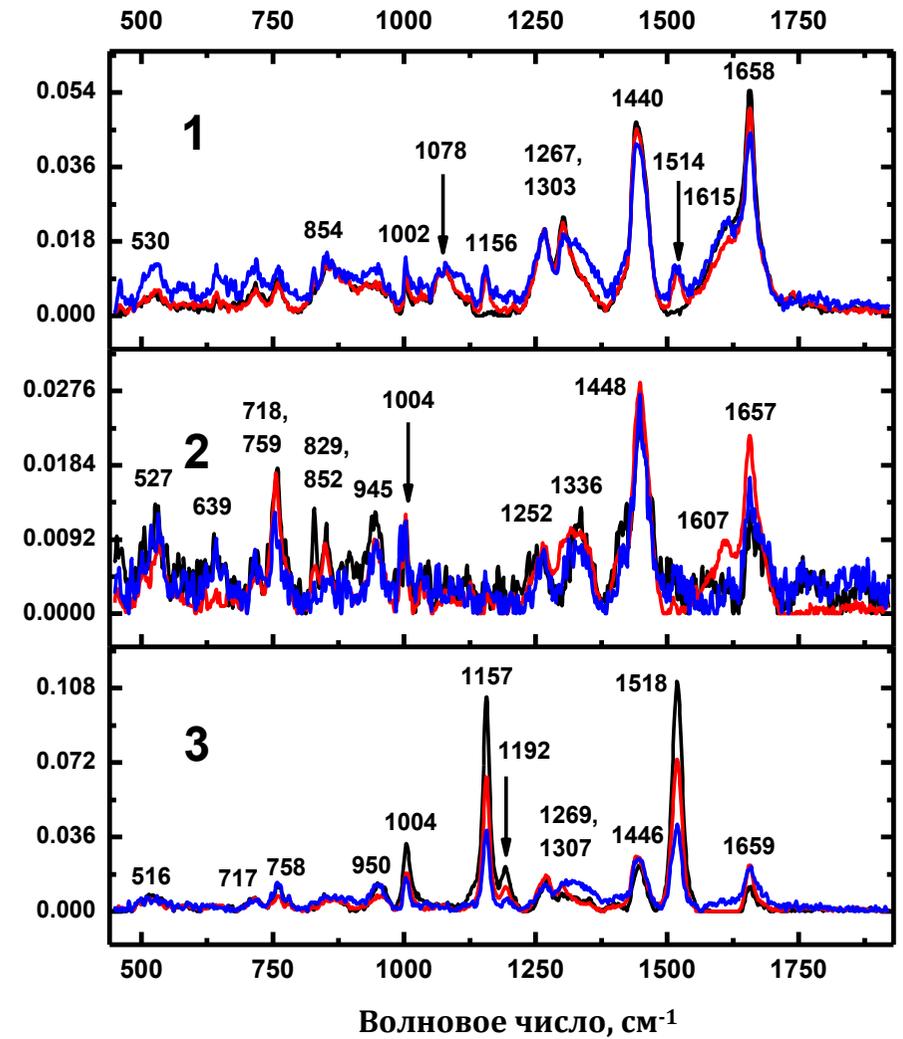
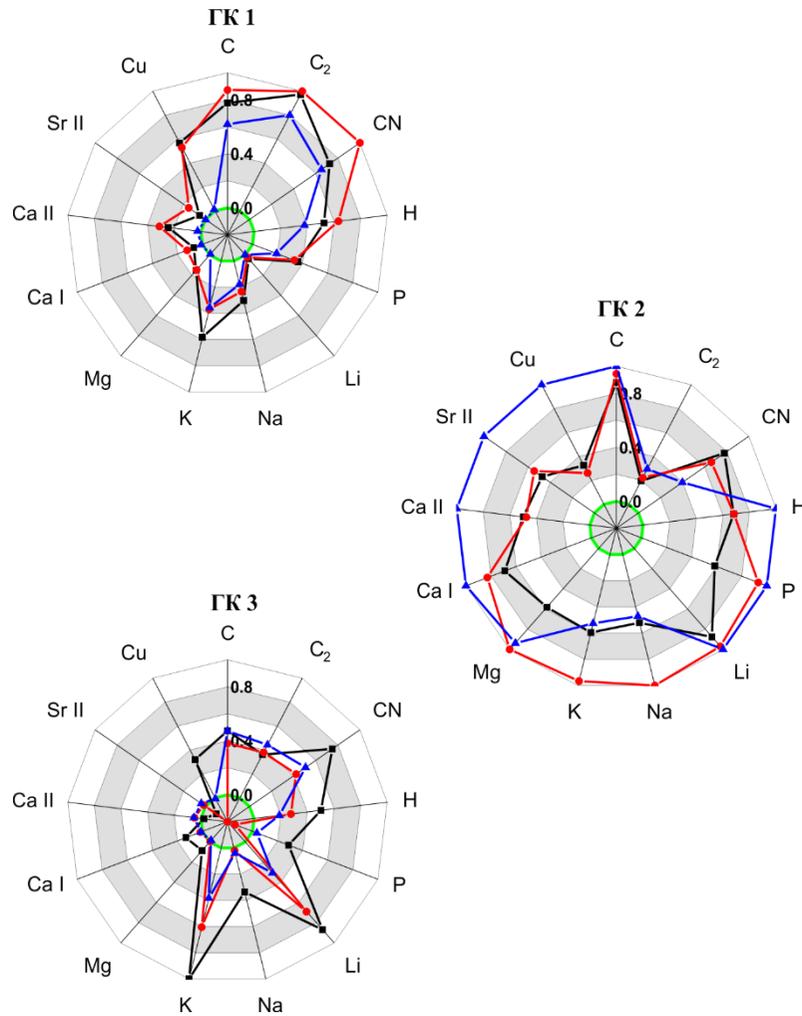


Рисунок П8. Результаты НМР для объединённых спектров ЛИП и КР (поднабор *Calanoida*, 14 образцов): а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

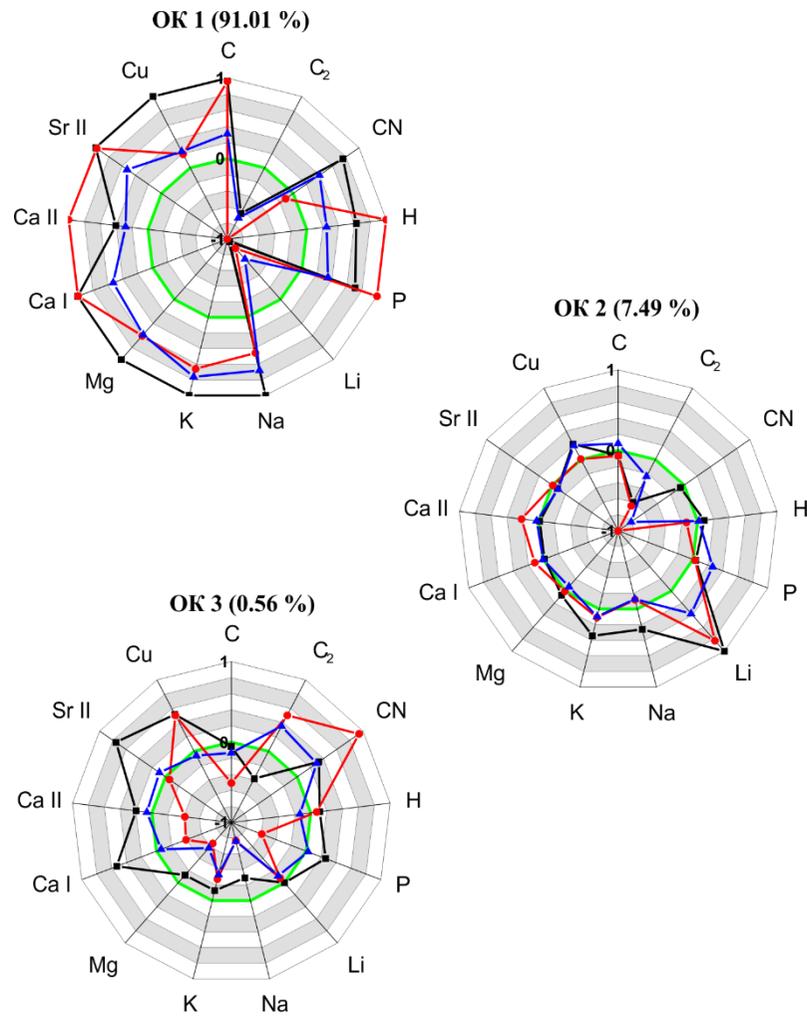
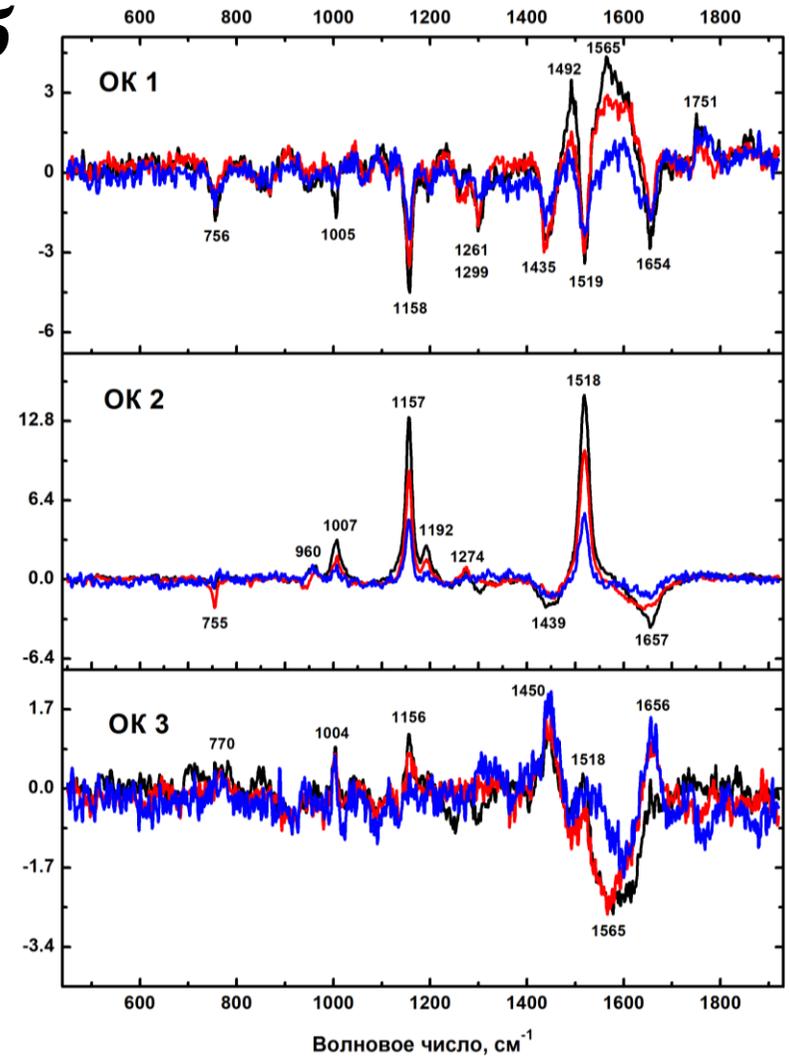
a**б**

Рисунок П9. Результаты ComDim–МГК для объединённых спектров ЛИП и КР: *a*) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; *б*) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

б

а

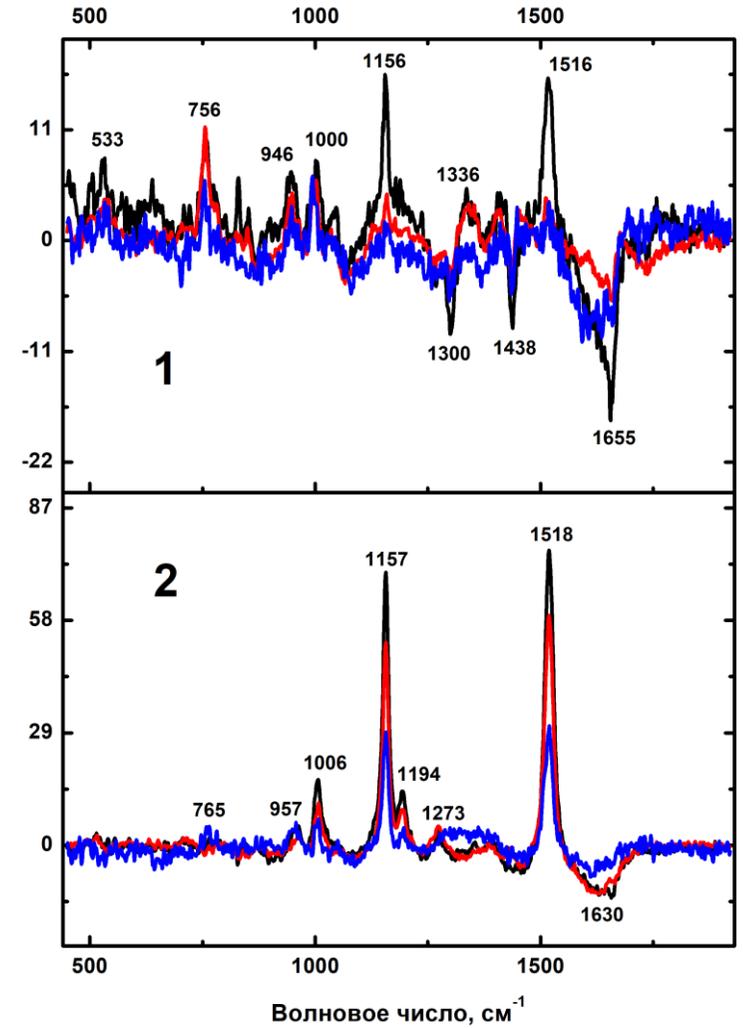
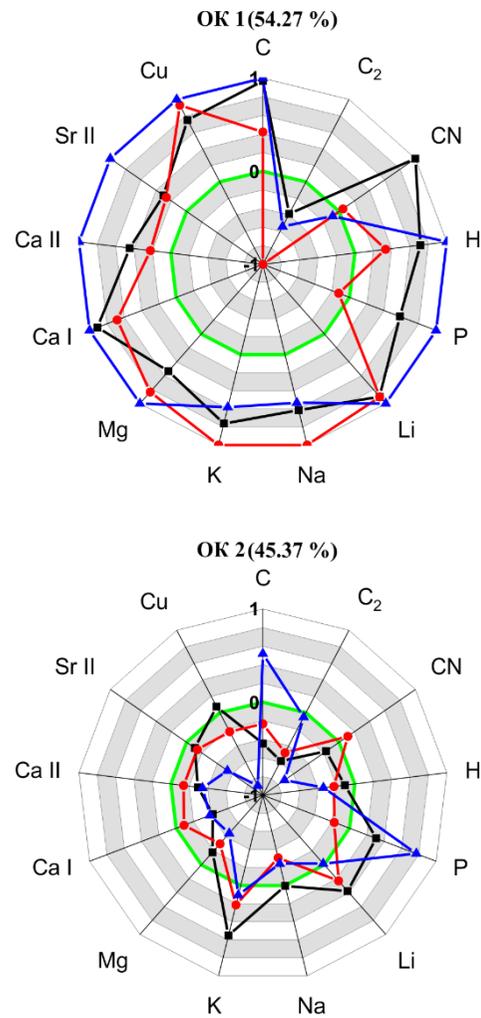


Рисунок П10. Результаты ComDim–МГК для объединённых спектров ЛИП и КР (поднабор *Calanoida*, 14 образцов): а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

б

а

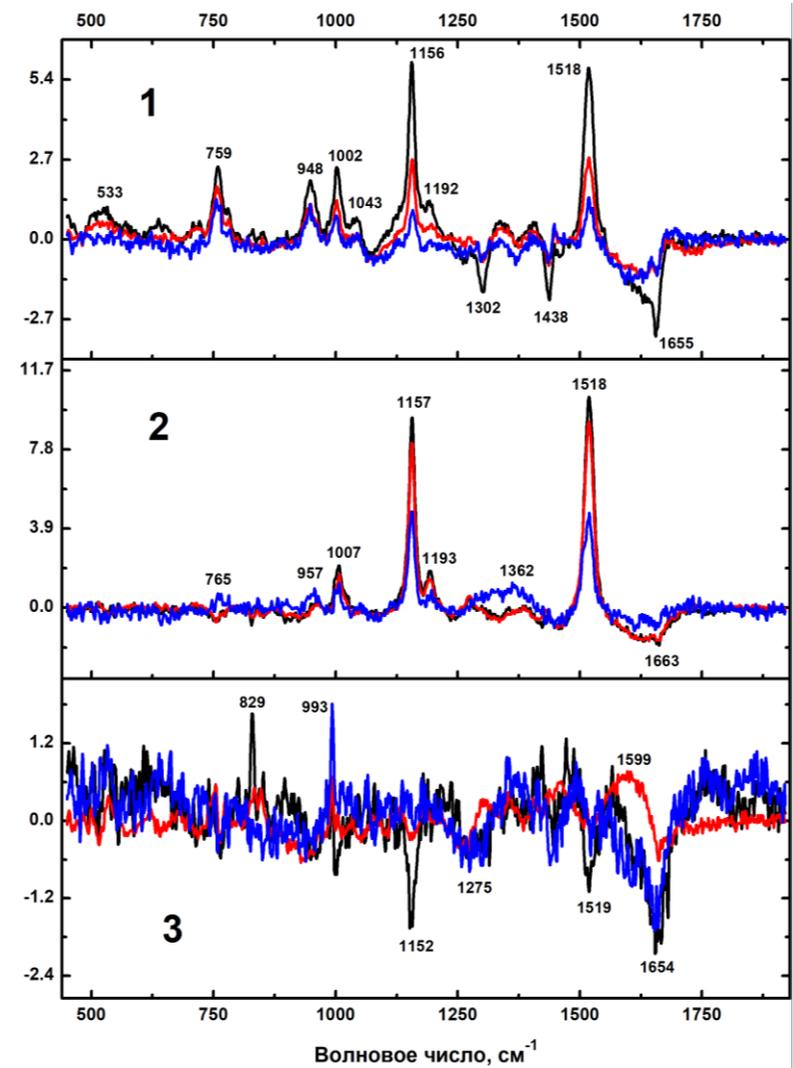
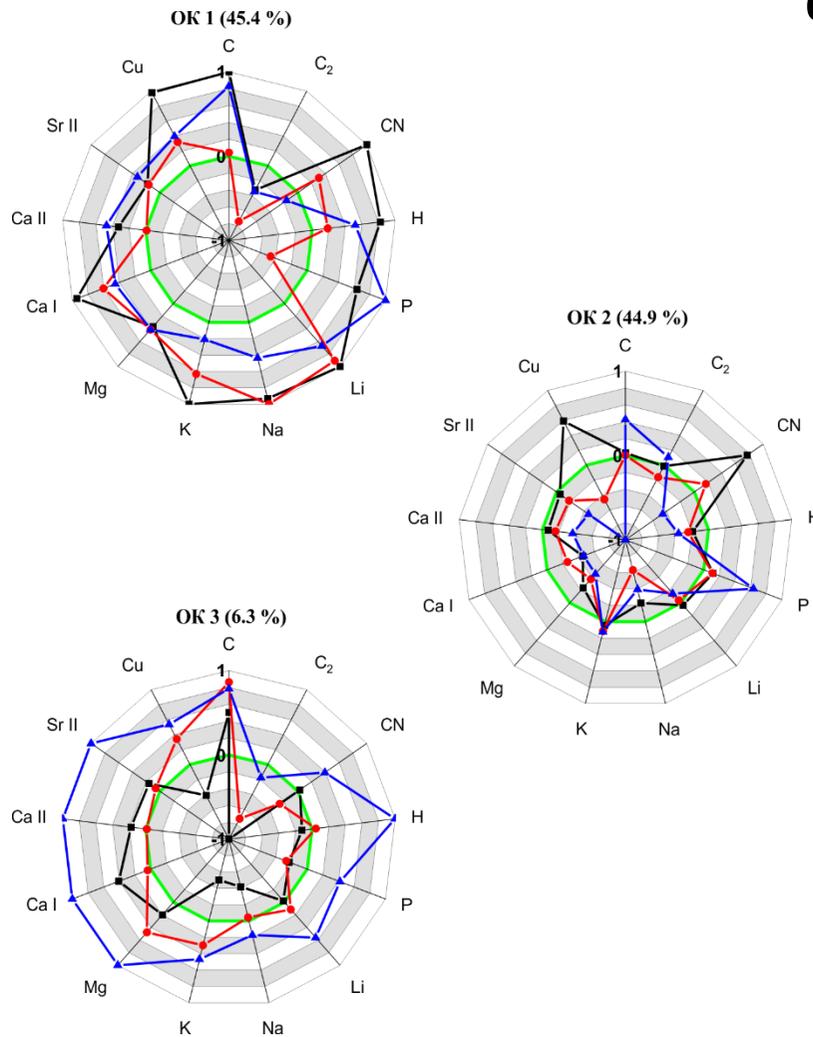


Рисунок П11. Результаты ComDim-АНК для объединённых спектров ЛИП и КР (поднабор *Calanoida*, 14 образцов): а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.

б

а

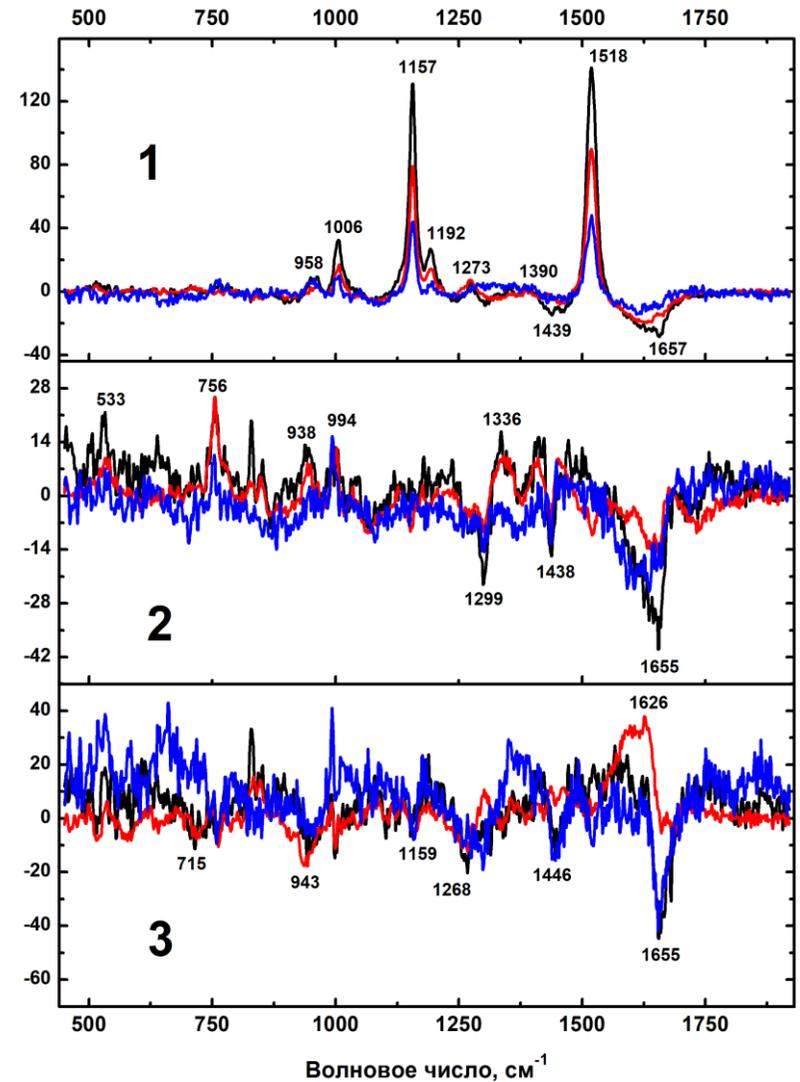
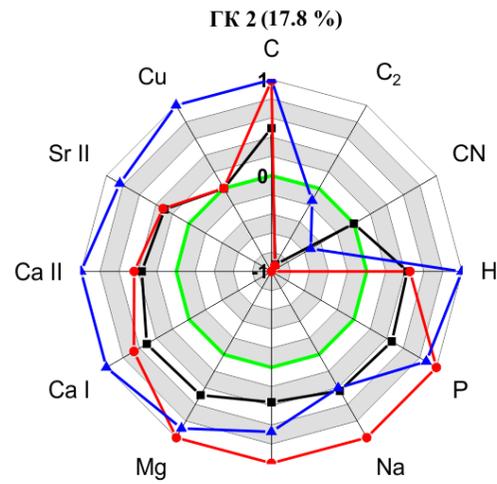
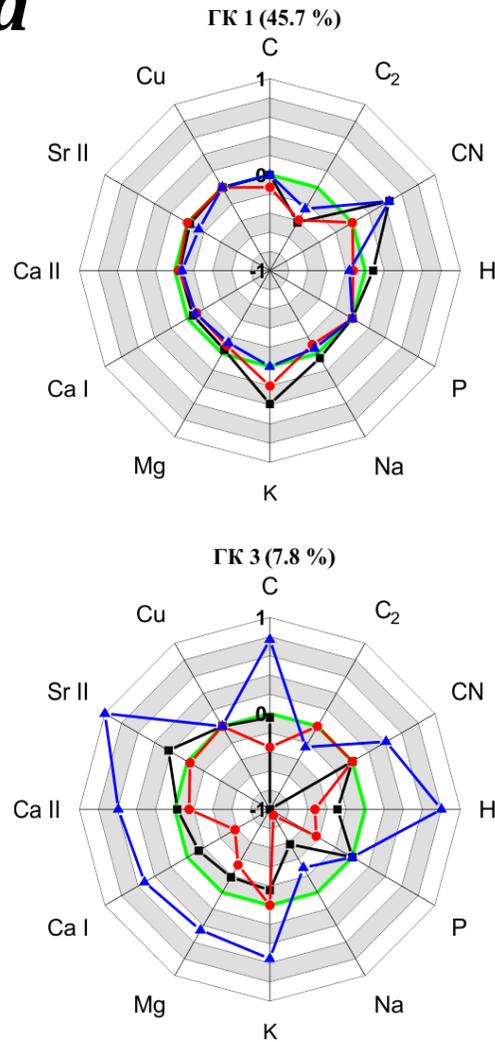


Рисунок П12. Результаты МГК для объединённых спектров ЛИП и КР после исключения сигналов Li (поднабор *Calanoida*, 14 образцов): а) интегралы избранных эмиссионных сигналов на графиках нагрузок (см. табл. 3.10), нормированные на соответствующие максимальные значения; б) участки нагрузок, соответствующие спектрам КР. Чёрным, красным и синим цветами показаны, соответственно, тёмный, промежуточный и светлый материалы. Ширина серых и белых колец равна 0.2.