

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
В ВЫДЫХАЕМОМ ВОЗДУХЕ МЕТОДОМ ГХ-ТД-МС**

Уколов А.И.* , Шачнева М.Д., Чиков А.Е., Егоров Н.А., Радилов А.С.

ФГУП «Научно-исследовательский институт

гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России

188663 Ленинградская область, Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский,

ст. Капитолово, корп. № 93

**E-mail: AntonUkolov@gmail.com*

Резюме: Разработана методика измерений концентраций ацетона, бутанола-1, бутанона-2, гексаналя, пентаналя, изопрена, масляной, пропионовой и уксусной кислот в выдыхаемом воздухе методом газовой хроматомасс-спектрометрии с термодесорбцией (ГХ-ТД-МС). Количественное определение выполняется методом относительной градуировки с использованием ацетона-d₆ в качестве внутреннего стандарта, причем стандарт вводится непосредственно в контейнер с пробой воздуха, что позволяет учитывать потери аналитов и достигать наибольшей корреляции концентрации внутреннего стандарта и определяемых соединений. Показана необходимость учета минутного объема дыхания при нагрузочном тестировании в ходе апробации методики.

Ключевые слова: выдыхаемый воздух, газовая хроматография, масс-спектрометрия, термодесорбция.

**GC-TD-MS QUANTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS
IN EXHALED BREATH**

A.I. Ukolov*, M.D. Shachneva, A.E. Chikov, N.A. Egorov and A.S. Radilov

Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology Federal State

Unitary Enterprise, Federal Medical Biological Agency of Russia

Build. 93, Kapitoloovo Station, g/p Kuz'molovsky, Vsevolozhsky District, 188663 Leningrad

Region, Russian Federation

**E-mail: AntonUkolov@gmail.com*

Abstract: A method has been developed for quantification of concentrations of acetone, butanol-1, butanone-2, hexanal, pentanal, isoprene, butyric, propionic, and acetic acids in exhaled air using the GC-MS with thermal desorption. Quantitative determination is performed with the using acetone-d₆ in the standard standard. An aprobation of method was performed during endurance test.

Key words: exhaled breath air, gas chromatography, mass spectrometry, thermal desorption.

Введение

Анализ качественного и количественного состава выдыхаемого воздуха (далее – ВВ) является неинвазивным методом диагностики который позволяет выявлять развитие многих заболеваний на ранних стадиях [1].

ВВ преимущественно состоит из азота, кислорода, CO₂, инертных газов и водяного пара. Однако помимо основных компонентов он содержит следовые количества летучих органических соединений (ЛОС) [2], среди которых наиболее изученным является ацетон, образующийся в печени из ацетил-КоА, с двумя другими кетоновыми телами: ацетоуксусной кислотой и 3-гидроксимасляной [3]. Известно, что концентрации ацетона являются биомаркерами физической нагрузки, голодания и множества других состояний организма [1]. Кроме ацетона, воздух содержит спирты: метанол [5], этанол [6], пропанол [6], а также незначительное количество сульфидов и дисульфидов, в то время как наличие меркаптанов в выдыхаемом воздухе может свидетельствовать о заболеваниях печени [1]. Высокие концентрации летучих карбоновых кислот являются маркерами цирроза печени [7]. В норме ВВ содержит аммиак [8], в то время как органические амины - диметиламин и триметиламин обнаружены только в пробах пациентов с терминальной стадией почечной патологии [1].

ВВ содержит ряд углеводородов: метан, этан и изопрен (2-метилбутадиен-1,3). Метан является продуктом жизнедеятельности бактерий, в то время как этан является естественным метаболитом и маркером перекисного окисления липидов [9]. Концентрации изопрена в выдыхаемом воздухе значительно превышают концентрации других углеводородов [1]. Изопрен образуется при мевалонатном пути биосинтеза холестерина [10]. У пациентов с раком легких выявлены пониженные концентрации изопрена, которые коррелируют с активацией иммунной системы.

Из всего многообразия компонентов ВВ в группу целевых соединений мы включили только эндогенные метаболиты, которые образуются в организме человека, а не поступают с пищей и не являются продуктом жизнедеятельности микроорганизмов в ЖКТ, например, аллилизотиоцианат, аллилметилсульфид, диметилдисульфид, 2-метилтиофен, ацетоин, фурфураль и пр. Другим ограничением являются возможности выбранной методики отбора и анализа проб: отбор ВВ на сорбционные трубки с последующим газохроматографическим анализом с масс-селективным детектированием (ГХ-ТД-МС). Такой метод не позволяет определять в ВВ соединения которые не поглощаются сорбентом – метан,

этан, оксид азота I и пр. В таблице 1 приведен список соединений, определяемых с использованием разработанной методики.

Цель работы

Разработка и валидация методики определения избранных летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе методом ГХ-ТД-МС, а также оценка пригодности методики для поиска новых биомаркеров.

Материалы и методы

В работе использовали газовый хроматограф Agilent 7890A с масс-селективным детектором 5975С. Хроматограф оборудован кварцевой капиллярной колонкой HP-Plot-Q, 30 м × 0,32 мм × 20 мкм. Термодесорбер АСЕМ 9300 (CDS Analytical) оборудован фокусирующими трубками 4-1/2" L с 60:80 mesh Tenax-TA. Для отбора проб использовали аспиратор ОП-442ТЦ. Условия термодесорбции: газ-носитель - гелий, температурная программа десорбции от 40 °С до 250 °С, продолжительность десорбции 5 мин.

Объёмная скорость газа-носителя через колонку - 1,7 мл/мин, температурная программа термостата колонки от 40 °С (3 мин) до 240°С со скоростью 10 °С/мин, в конце программы – изотерма продолжительностью 17 мин.

Ионизация электронами 70 эВ, регистрация полного ионного тока в диапазоне m/z от 29 до 200. Аналитические характеристики определяемых соединений приведены в табл. 1.

Таблица 1. Физико-химические и аналитические характеристики целевых соединений

Соединение	ВУ, мин	m/z	ρ , г/см ³	$T_{кип}$, °С	P, кПа	Мин-макс, нг/л	CV, %
Ацетон-d ₆	14,820	46, 64	0,784	56	24.5	-	-
Бутанон-2	14,921	72, 86	0,805	80	9.5	240-4636	44
Ацетон	14,950	43, 58	0,784	56	24.5	85-976	112
Изопрен	15,990	53, 67	0,681	34	60.8	5-211	9
Бутанол-1	18,048	41, 56	0,810	118	0.5	29-818	31
Уксусная к-та	19,594	45, 60	1,049	118	1.6	32-1692	14
Пентаналь	21,248	42, 68	0,810	103	3.4	47-1935	51
Пропион. к-та	21,913	57, 74	0,990	141	0.3	5-208	30
Гексаналь	23,342	56, 82	0,814	129	1.3	332-13058	41
Масляная к-та	24,279	60, 73	0,956	163	0.1	2690-81734	11

Примечание: ВУ – время удерживания компонентов на колонке HP-PlotQ 30 м; m/z – характеристичные ионы; $T_{кип}$ – температура кипения; P - давление насыщенных паров при 20 °С; Мин-макс – минимальные и максимальные концентрации выявленные в ходе исследования; CV – коэффициент вариации концентраций в течение дня.

Для отбора образца выдыхаемого воздуха доброволец-испытуемый три раза продувал контейнер BioVOC (Bio-VOC breath sampler кат. № С-ВЮ01) затем в контейнер с образцом выдыхаемого воздуха вводили 25 мкл газовой смеси из бюретки с внутренним стандартом (ацетоном-d₆). При отборе проб контейнер нагревали до 55 °С для исключения

сорбции тяжелых компонентов. Затем к контейнеру подсоединяли сорбционную трубку (4-1/2" L с 20:35 mesh Tenax-TA/Carboxen1000/CarbosieveS111) и аспиратор, время аспирации составляло 90 с, поток через трубку составлял 0,5 л/мин. Затем трубку помещали в герметичный контейнер до проведения анализа.

Результаты и их обсуждение

Для всех соединений была определена воспроизводимость определения, например, при определении изопрена методом абсолютной градуировки среднее квадратическое отклонение составляет 11,0 %, в то время как при использовании внутреннего стандарта (ацетона-d₆) этот показатель можно снизить до 9,2 %.

В ходе предварительных исследований нами были определены минимальные и максимальные концентрации определяемых соединений (см. табл. 1), а также оценка суточных колебаний концентраций определяемых соединений в виде коэффициентов вариации. Оценка суточных колебаний концентраций определяемых соединений была проведена следующим образом: у одного добровольца-испытуемого отбирали 5 образцов выдыхаемого воздуха с промежутками 1-2 часа, в том числе через 1 час после приема пищи.

В ходе апробации методики была показана необходимость обязательной спирометрии в ходе тестирования добровольцев-испытуемых, так как в ходе физической нагрузки значительно возрастает объем вентиляции легких (с 11 л/мин в покое до 140-150 л/мин в пике нагрузки), а концентрации ЛОС уменьшаются (см. рис. 1). Измерение объема выдыхаемого воздуха позволило приводить концентрации соединений не в единицах концентрации (нг/л), а в виде т.н. молярного потока (моль/мин) который показывает общее количество вещества, выделяемое организмом. Можно заметить, что разница в суммарных концентрациях ЛОС составляет 2 раза даже после ходьбы в течение одной минуты. Через 2 минуты легкого бега разница составляет 7 раз по сравнению с покоем.

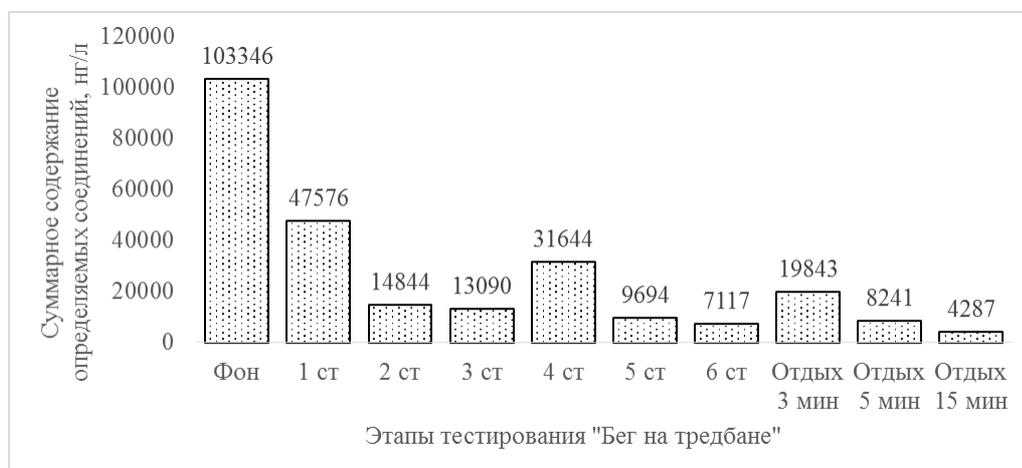


Рисунок 1 – Изменение суммарных концентраций ЛОС в ходе теста «Бег на тредбане»

Заключение

Разработана методика измерений концентраций ацетона, бутанола-1, бутанона-2, гексаналя, пентаналя, изопрена, масляной, пропионовой и уксусной кислот в выдыхаемом воздухе методом ГХ-ТД-МС. Количественное определение выполняется методом относительной градуировки с использованием ацетона-d₆ в качестве внутреннего стандарта, причем стандарт необходимо вводить непосредственно в контейнер с пробой воздуха, что позволяет учитывать потери аналитов и достигать наибольшей корреляции концентрации внутреннего стандарта и определяемых соединений. При отборе проб контейнер необходимо нагревать до 55 °С для исключения сорбции тяжелых компонентов. Показана необходимость спирометрии в ходе нагрузочного тестирования добровольцев испытуемых.

Список литературы

1. Amann, A. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva / A. Amann, B. de Lacy Costello, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby // *J. Breath Res.* – 2014. – N 8. – P. 1-17.
2. Wang, T. Analysis of breath, exhaled via the mouth and nose, and the air in the oral cavity / T. Wang, A. Pysanenko, K. Dryahina, P. Spänzel, D. Smith // *J. Breath Res.* – 2008. – N 2. – P 1-13.
3. Crowley, L. An Introduction to Human Disease: Pathology and Pathophysiology Correlations 9th Edition / Jones & Bartlett Publishers, 2013. – 815 p.
4. Statheropoulos, M. Analysis of expired air of fasting male monks at Mount Athos / M. Statheropoulos, A. Agapiou, A. Georgiadou // *J. Chromatogr. B.* 2006. – V. 832. – P. 274–279.
5. Eriksen, S.P. Methanol in normal human breath // *Science.* 1963. – V. 141. – P. 639–640.
6. Metabolites Breath Analysis in Disease Diagnosis: Methodological Considerations and Applications / C. Lourenzo, C. Turner. // *Metabolites.* 2014. – V. 4. – P. 465-498.
7. Chen, S. 1970 Volatile fatty acids in the breath of patients with cirrhosis of the liver / S. Chen, V. Mahadevan, L. Zieve // *J. Lab. Clin. Med.* 1970. – V. 75. P. 622–627.
8. Davies, S.J. Breath analysis of ammonia, volatile organic compounds and deuterated water vapor in chronic kidney disease and during dialysis / S.J. Davies, P. Spänzel, D. Smith // *Bioanalysis.* 2014. - V. 6. - N. 6. – P. 843-857.
9. Bingham E., Powell C.B., C.H. Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. / John Wiley & Sons. New York, N.Y., 2001. – 487 p.
10. Gelmont, D. Isoprene—the main hydrocarbon in human breath / D. Gelmont, R.A. Stein, J.F. Mead // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981. – V. 99. – P. 1456–1460.