

УДК 543.544.33, 616.24-006, 616.24-008.7

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ АНАЛИЗА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ–МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ РАКА ЛЕГКИХ

© 2019 г. И. С. Горбунов^{a, *}, А. Р. Губаль^a, А. А. Ганеев^{a, b}, О. В. Родинков^a, Л. А. Карцова^a, Е. А. Бессонова^a, А. И. Арсеньев^c, А. О. Нефедов^c, Л. А. Краева^d

^aСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
198504 Россия, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

^bИнститут токсикологии Федерального медико-биологического агентства России
192019 Россия, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1

^cНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова Минздрава РФ
197758 Россия, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68

^dСанкт-Петербургский Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
197101 Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

*e-mail: i.s.gorbunov@spbu.ru

Поступила в редакцию 27.10.2018 г.

После доработки 06.01.2019 г.

Принята к публикации 23.04.2019 г.

Оптимизированы процедуры отбора, подготовки и хранения проб выдыхаемого воздуха, а также условия определения в выдыхаемом воздухе летучих органических соединений методом газовой хроматографии–масс-спектрометрии (ГХ–МС), наличие или изменение концентрации которых может быть вызвано раком легких. Схема анализа включает групповое сорбционное концентрирование с последующими термодесорбцией и определением аналитов методом ГХ–МС. Для отбора проб использованы полимерные мешки из пленки Tedlar[®]. Установлены условия и сроки хранения проб в мешках и сорбционных трубках. Предложен способ очистки и кондиционирования мешков. Для целей концентрирования компонентов выдыхаемого воздуха использованы гидрофобные сорбенты (Porapak[™] P, Porapak[™] Q, Tenax[®] TA) и трехсекционные трубки, содержащие Tenax[®] GR, Carborack[™] B и Carbosieve[®] S-III. Оценена их относительная эффективность (остаточный фон газовыделений из сорбента, величина аналитического сигнала, эффективность сорбции/десорбции, эффективность хранения). Оптимизированы условия концентрирования летучих органических соединений (объем и скорость аспирирования, время и температура термодесорбции). Идентифицированы и оценены содержания основных летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе условно здоровых добровольцев.

Ключевые слова: выдыхаемый воздух, рак легких, сорбционное концентрирование, газовая хроматография–масс-спектрометрия, летучие органические соединения.

DOI: 10.1134/S0044450219110045

Злокачественные новообразования – одна из основных причин смерти и инвалидизации населения развитых стран. По данным Международного агентства по изучению рака заболеваемость злокачественными новообразованиями в мире превышает 14 млн случаев в год, из них свыше 1.8 млн (13%) приходится на рак легких (РЛ) – ведущую локализацию в общей структуре онкологической заболеваемости [1]. Одно из направлений исследований последних лет на кафедре аналитической химии Института химии СПбГУ – создание метода ранней диагностики РЛ на основе анализа выдыхаемого воздуха (ВВ) человека [2].

Эффективность лечения РЛ зависит от распространенности опухоли в месте ее локализации на момент начала реализации клинических мероприятий. На протяжении последних 30–40 лет около 70% заболеваний РЛ выявляются на III–IV стадии, когда уровень выживаемости больных в течение пяти лет составляет 0–5% [3]. Это обусловлено практически полным отсутствием характерных симптомов и определяющих признаков РЛ, недостаточностью достаточно высоко чувствительных, специфичных и приемлемых методов скрининга, врачебными ошибками, поздним обращением больного к врачу [4].

Современная программа скрининга раннего РЛ включает следующую схему обследования: рентгенография или низкодозная спиральная компьютерная томография грудной клетки, цитологическое исследование мокроты и аутофлуоресцентная бронхоскопия. Все перечисленные методы нельзя назвать эффективными, поскольку каждый из них имеет ряд существенных недостатков [5–7]. Это создает острую необходимость в разработке новых методов скрининга раннего РЛ. В контексте создания такого метода развиваются принципиально иные подходы, на которые возлагаются большие надежды: молекулярно-генетический анализ и анализ ВВ.

Анализ ВВ имеет ряд преимуществ по сравнению с анализом биологических жидкостей [8]. Его отличают простота и неинвазивность процедуры отбора проб, относительно малые матричные влияния, возможность проведения измерений сколь угодно часто в режиме on-line. Недостаток этого метода заключается в возможной неоднозначности взаимосвязи между содержанием соединений в ВВ и определенным заболеванием, т.е. в невысокой специфичности. Существует большое число публикаций по этой теме в различных областях медицины: инфектология [9], респираторные заболевания [10], онкологические заболевания [11] и др. Однако для клинического использования одобрено ограниченное количество дыхательных тестов [12].

Возможность контроля различных процессов в организме путем анализа ВВ основана на особенностях метаболизма и газообмена. Кислород и оксид углерода(IV) пассивно диффундируют через альвеолярно-капиллярную мембрану, увлекая за собой более 3000 идентифицированных летучих органических соединений (ЛОС) с суммарной концентрацией менее 100 млн^{-1} [13, 14]. Водяной пар, которым насыщен ВВ, также участвует в переносе многих полярных соединений [15]. Метаболические пути образования эндогенных ЛОС известны только для ограниченного числа соединений [16–18]. Другие ЛОС – экзогенные, т.е. являются результатом внешнего загрязнения посредством вдыхаемого воздуха, приема пищи либо проникновения через кожу [19].

Ряд методов позволяет определять наличие РЛ на основе анализа ВВ [2]. Из них наиболее эффективными при проведении скрининга являются масс-спектрометрия с реакцией переноса протона [20], спектрометрия ионной подвижности с мультикапиллярной колонкой [21] и особенно мультисенсорная система типа “электронный нос” [22]. Однако эти методы недостаточно селективны и не всегда позволяют получить однозначный результат. Наиболее универсальным, высокоселективным и чувствительным методом анализа ВВ является ГХ–МС, позволяющая оце-

нивать содержания всех известных в настоящее время маркеров РЛ. Его недостатками являются трудоемкость, низкая производительность и требуемая высокая квалификация аналитиков, выполняющих анализ. Сама процедура проведения анализа и обработки его результатов при современном уровне автоматизации обычно не вызывает затруднений. Ключевым отличием от упомянутых выше методов является практическая невозможность проведения on-line анализа и, как следствие, необходимость транспортировки и хранения пробы.

Анализ ВВ технически сложен. В зависимости от используемой методологии разброс результатов достаточно широк. Существует внушительный список маркеров РЛ, но однозначного экспериментально подтвержденного набора нет. Одна из причин этого – отсутствие каких-либо стандартных протоколов или рекомендаций по отбору, хранению и анализу проб ВВ для диагностики заболеваний [23]. Обычно схема анализа ВВ включает четыре последовательные стадии: отбор пробы, групповое концентрирование компонентов ВВ, анализ и обработка полученных данных.

На этапе отбора возможна наибольшая дискриминация пробы. На итоговый результат влияют техника дыхания [24], кратность отбора [25], тип ВВ [26], способ отбора, хранения и транспортировки [27–29], влияние эндогенных соединений, присутствующих в комнатном воздухе, а также микробный состав полости рта в норме и при различных патологиях [30–32]. Один из наиболее важных этапов подготовки пробы – ее хранение. Для сравнения результатов метода ГХ–МС и других упомянутых выше методов необходима транспортировка отобранных проб в место проведения анализа. Таким образом, должна быть обеспечена возможность хранения отобранных проб в течение не менее 24–48 ч. В противном случае организовать подобные исследования чрезвычайно сложно, а в ряде случаев – невозможно. С целью группового концентрирования используют криогенное концентрирование и различные сорбционные методы, такие как концентрирование на твердых сорбентах [33] и твердофазная микроэкстракция [34].

Определение ВВ методом ГХ–МС подразумевает большое количество манипуляций и длительную работу с пробой, что сопряжено с риском дискриминации состава проб, влияющей на достоверность и прогностическую силу метода в диагностике заболевания. Поэтому вопрос оптимизации и стандартизации этих процедур имеет ключевое значение. В опубликованных до настоящего времени работах по анализу ВВ не уделено внимание оптимизации процедур отбора и подготовки проб к анализу, не исследуются возможности хранения отобранных проб ВВ.

Таблица 1. Параметры системы газовой хроматографии–масс-спектрометрии с термодесорбцией

Параметр	Значение
Температура печи пиролизера	230°C
Температура интерфейса пиролизера	230°C
Температура инжектора	230°C
Температурная программа термостата колонки	40°C (3 мин)–30 град/мин–220°C (0 мин)–40 град/мин–300°C (2 мин)
Газ-носитель	Гелий (марка “6.0”)
Расход газа-носителя	1.20 мл/мин (общий поток 28.2 мл/мин)
Соотношение деления потока газа-носителя	1 : 20
Температура интерфейса масс-спектрометра	200°C
Температура ионного источника	200°C
Диапазон сканирования масс-спектра	30–250 ед. <i>m/z</i>
Скорость сканирования спектра	1250 а. е. <i>m/z</i>

Цель настоящей работы – оптимизация условий отбора проб ВВ, группового концентрирования ЛОС и их определения методом ГХ–МС для неинвазивной диагностики РЛ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пробы ВВ условно здоровых добровольцев отбирали в газовые мешки из полимерной пленки Tedlar® емкостью 1 л (Supelco, США) и 3 л (Restek, США). Новые мешки перед использованием кондиционировали абсолютным этанолом порциями по 100–150 мл при 50°C и сушили путем 15–20-кратной продувки газообразным сжатым азотом (марка “ВЧ”, ГОСТ 10157-79, ООО “Центргаз”, Россия).

Процедура отбора проб ВВ заключалась в следующем: доброволец ополаскивает ротовую полость водой, спокойно дышит, делает максимально глубокий вдох, затем медленно выдыхает воздух в мешок, используя диафрагменное дыхание, чтобы удалить максимальный объем воздуха из легких. Процедуру повторяли несколько раз до заполнения всего объема мешка. Мешок соединяли с одноразовым мундштуком, в качестве которого использовали цилиндр стерильного медицинского шприца. Мешки с пробами ВВ хранили при температуре окружающего воздуха $22 \pm 3^\circ\text{C}$ в защищенных от воздействия прямого солнечного света и источников тепла условиях. Продолжительность хранения проб ВВ от отбора до начала анализа, за исключением экспериментов по хранению проб, составляла не более 3 ч.

Для оптимизации условий анализа методом ГХ–МС выбрали набор из девяти ЛОС: 1,2-диметилбензола, 1,3-диметилбензола, бензальдегида, гептана, додекана, метилциклогексана, пропан-1-ола, пропионовой кислоты и этилбензола, которые принадлежат к разным классам ор-

ганических соединений (в том числе изомеры) и по данным [35–38] предположительно являются маркерами РЛ.

Для оценки скорости деградации пробы провели серию экспериментов. Четыре очищенных мешка наполняли ВВ условного здорового добровольца, концентрировали аликвоту пробы (200 мл) с помощью сорбционной трубки (СТ) и анализировали в выбранном режиме (табл. 1). Полученное значение аналитического сигнала принимали за 100%. Затем мешки с ВВ помещали на хранение в темное место при комнатной температуре, через определенные промежутки времени отбирали аликвоты и анализировали. Для термодесорбции (ТД) сконцентрированных ЛОС использовали многофункциональный пиролизер EGA/PY-3030D (Frontier Laboratories Ltd., Япония) с микропроточной криогенной ловушкой MJT-1030Ex (Frontier Laboratories Ltd., Япония) для криофокусирования.

Газохроматографический анализ выполняли на газовом хроматографе GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Япония) с масс-спектрометрическим детектором Dual Stage TMR. Разделение аналитов проводили на капиллярной колонке Ultra ALLOY®-5 (Frontier Laboratories Ltd., Япония) длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной неподвижной фазы 0.25 мкм (95% диметилполисилоксан, 5% фенильных групп). Выбор колонки обусловлен тем, что ее чаще всего применяют в работах по анализу ВВ [19, 39, 40]. Параметры системы ТД–ГХ–МС во время анализа представлены в табл. 1. Соединения идентифицировали путем сравнения времен удерживания индивидуальных веществ и компонентов пробы ВВ, а также сравнением экспериментальных и библиотечных масс-спектров (NIST08, версия 2.0, 220 тыс. соединений), полученных ионизацией электрона-

ми, с использованием автоматизированных систем поиска (GCMS Solution, версия 2.72).

Материалом для бактериологического исследования служили соскобы с 10 см² внутренней поверхности газового мешка и 5 мл пробы ВВ из мешка (условно здорового добровольца). Материал с поверхности пакета отбирали стерильным тампоном, смоченным в физиологическом растворе, засекали на “кровяной” агар, среду Сабу-ро, желточно-солевой и мясопептонный агар в чашках Петри. Выдыхаемый воздух через шприц засекали в стерильный флакон с мясопептонным бульоном в соотношении 1 : 10 и инкубировали в течение 16 ч при 37°C. Исследования проводили согласно рекомендациям [41, 42]. После подсчета выросших колоний и получения чистой культуры проводили идентификацию микроорганизмов, изучали морфологию колоний, осуществляли микроскопию выросших микроорганизмов, проводили биохимическое типирование с использованием тест-систем API[®] Coryne (bioMérieux, Франция). Все полученные изоляты независимо идентифицировали методом масс-спектрометрии. Исследуемую культуру наносили в виде тонкого мазка на чип MSP 96 (Bruker Daltonics, Германия), сверху наслаивали 0.001 мл насыщенного раствора матрицы ((*E*)-2-циано-3-(4-гидроксифенил)проп-2-еноат в среде, содержащей 50% ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты). Масс-спектры собирались в автоматическом режиме на масс-спектрометре MicroflexTM LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия). Для анализа спектров и идентификации микроорганизмов использовали программное обеспечение MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Для концентрирования ЛОС использовали СТ. Изучены различные типы и марки сорбентов: PorapakTM P (50/80 меш, Waters Associates, Inc., США), PorapakTM Q (50/80 меш, Waters Associates, Inc., США), Tenax[®] TA (60/80 меш, Scientific Instrument Services, Inc., США), трехсекционные трубки на основе Tenax[®] GR (35/60 меш), CarborapakTM B (60/80 меш) и Carbosieve[®] S-III (60/80 меш). Перед наполнением СТ твердые сорбенты активировали, т.е. удаляли соединения (в частности, мономеры, адсорбировавшиеся высококипящие соединения и т.д.), блокирующие активные центры на поверхности сорбента. Для этого сорбенты обрабатывали в аппарате Сокслета в течение 24 ч последовательно пропан-2-оном, пентаном и абсолютизированным этоксиэтаном. После обработки сорбенты сушили в течение 48 ч в чашках Петри в стеклянном вакуум-эксикаторе (остаточное давление не более 10⁻² Па). Использовали кварцевые трубки длиной 85 мм, внутренним диаметром 2 мм, внешним диаметром 4 мм. Сорбционные трубки заполняли сорбентом высотой 60 ± 3 мм на расстоянии 5 мм от нижнего края

(количество сорбента ограничено зоной нагрева печи термодесорбера). Гранулы полимерных сорбентов склонны к электризации и слипанию, поэтому непосредственно перед заполнением их замораживали в жидком азоте. После заполнения трубки закрывали с обоих концов пробками из силанизированной стекловаты (Restek, США).

Перед использованием СТ кондиционировали по следующей схеме: продували ток в направлении, противоположном направлению при отборе проб, каталитически очищенного гелия (содержание O₂ не более 1 млн⁻¹) при комнатной температуре и давлении 200 кПа в течение 15 мин и затем в течение 24 ч при 240°C для PorapakTM P и PorapakTM Q, при 340°C для Tenax[®] TA, при 300°C для трехсекционной трубки. По истечении времени нагрева СТ охлаждали до комнатной температуры и анализировали в обычном хроматографическом режиме для получения холостого показания, чтобы установить чистоту сорбента и выявить наличие артефактов. При отрицательных результатах тестирования (уровень холостого показания неприемлем) процедуру кондиционирования повторяли. Подготовленные СТ закрывали с помощью тефлоновых заглушек с обеих сторон и хранили до использования не более 1–2 нед.

Жидкие модельные смеси с концентрациями интересующих ЛОС 10, 1, 0.1 и 0.01 мл/л готовили объемно-объемным способом в мерных колбах емк. 10 мл (Schott Duran, Германия) с помощью автоматического микрошприца eVol XR (SGE Analytical Science, Австралия). В качестве растворителя использовали метанол (хроматогр. ч., J.T. Baker, Нидерланды). Смеси вводили в испаритель хроматографа с помощью микрошприца NanoVolume Syringe (SGE Analytical Science, Австралия). Жидкие модельные смеси использовали для получения градуировочных зависимостей аналитического сигнала (площадь под пиком полного ионного тока, мВ мс) от массы введенного ЛОС (нг). Величины пределов обнаружения ЛОС рассчитывали по 3σ-критерию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка газовых мешков к использованию. Согласно данным производителей пленку Tedlar[®] (поливинилфторид) изготавливают без применения пластификаторов [43]. Однако в остаточном фоне газовой выделений обнаруживаются артефакты: N,N-диметилацетамид и фенол (рис. 1). Установлено, что первое соединение выполняет роль растворителя поливинилфторида при его производстве, а второе — пластификатора [44]. В результате эмиссии N,N-диметилацетамида и фенола из материала мешка происходит не только дискриминация состава пробы, но и перегрузка сорбента, что резко снижает сорбцию целевых ЛОС из пробы ВВ.

Соотношение суммы аналитических сигналов основных макрокомпонентов ВВ (пропан-2-он и 2-метилбута-1,3-диен) и суммы сигналов N,N-диметилацетамида и фенола — 1 : 500 (рис. 1). Кондиционирование мешка при 80°C в течение 24 ч незначительно улучшает ситуацию (1 : 390). При использовании мешков другого производителя (Restek Corp.) появления артефактов в пробе не наблюдали. Таким образом, следует проверять качество мешков из пленки Tedlar® перед работой с ними.

Мешки используются многократно, поэтому необходима эффективная процедура их очистки из-за частичной сорбции некоторых целевых компонентов на внутренних стенках мешка. Предложено проводить очистку мешков многократным продуванием высококачественного инертного газа (Ar или N₂). Изучена зависимость аналитических сигналов компонентов, склонных к сорбции на стенках мешка, от кратности продувания (табл. 2). Установлено, что такие летучие соединения, как гептан и пропан-1-ол, удаляются довольно быстро, а относительно малолетучие додекан и этилбензол требуют большего количества продувок. Для эффективной очистки рекомендована 5–7-кратная продувка мешков после их использования.

Хранение проб выдыхаемого воздуха в мешках и сорбционных трубках. Из рис. 2 следует, что в течение 24 ч происходит изменение состава пробы ВВ, не превышающее инструментальную погрешность. Однако в дальнейшем происходит либо накопление ряда компонентов ВВ (гексан, гептан, 1-метил-4-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-1-ен, пропан-1-ол и др.), либо потеря других (бутановая и пропионовая кислоты, додекан). Потеря, по-видимому, объясняется сорбцией компонентов материалом мешка. Концентрирование ряда компонентов может быть вызвано жизнедеятельностью микроорганизмов и накоплением их метаболитов внутри замкнутого пространства мешка, поскольку влажная среда ВВ благоприятствует этому. Такое предположение согласуется с типичной S-образной кривой изменения количества метаболитов от времени. В предварительных исследованиях изучена возможность адгезии бактерий, персистирующих на слизистом эпителии верхних дыхательных путей, на внутренней поверхности мешка. Самые распространенные виды комменсалов ротовой полости в крайне низкой степени адгезировались на внутренней поверхности мешка для отбора ВВ. При микроскопии его поверхности отмечались единичные бактериальные клетки, которые после суточной экспозиции пробы ВВ в мешке не давали роста в питательной среде. В условиях отсутствия питательных веществ бактерии, попавшие при выдыхании воздуха на стенку мешка, не размножались, а с течением времени погибали. Таким образом, накопле-

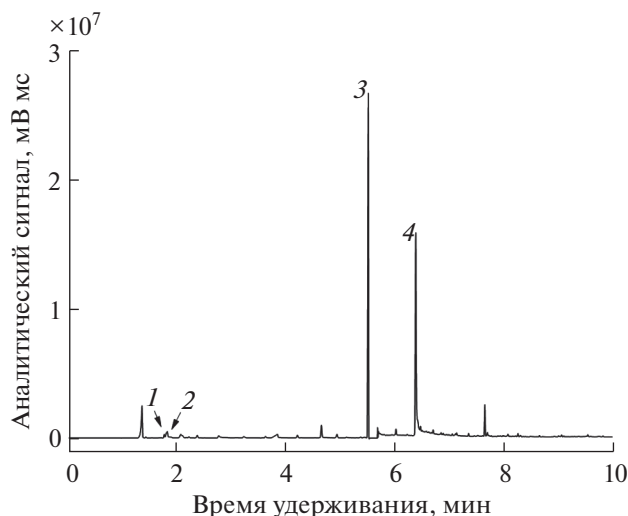


Рис. 1. Хроматограмма пробы выдыхаемого воздуха условно здорового добровольца, отобранная в мешок Supelco®: 1 — пропан-2-он, 2 — 2-метилбута-1,3-диен, 3 — N,N-диметилацетамид, 4 — фенол. Условия хроматографического анализа приведены в табл. 1.

ние регистрируемых веществ можно объяснить лишь остаточной жизнедеятельностью бактерий, находящихся в замкнутом пространстве мешка.

В то же время из ВВ, собранного сразу в питательную среду, высевались бактерии, характерные для верхних дыхательных путей. В случае воздуха, находившегося в мешке, отмечался скудный рост бактерий. Этот факт объясняется тем, что бактерии в отсутствие питательных веществ не способны поддерживать популяцию и постепенно отмирают. Таким образом, микробный состав ВВ существенно не влиял на результаты анализа.

Хранение в СТ обеспечивает лучшую сохранность целевых ЛОС из проб ВВ, что подтверждается экспериментальными данными (табл. 3), но только при условии герметичного закрытия концов СТ с помощью политетрафторэтиленовых пробок. Это обеспечивает неизменность состава пробы по сравнению с хранением в мешках, что может быть обусловлено отсутствием влаги, поскольку использовались гидрофобные сорбенты. Отмечена высокая эффективность хранения (от-

Таблица 2. Зависимость эффективности очистки мешка (%) от кратности продувки

Соединение	Кратность продувки						
	1	2	3	4	5	6	7
Гептан	97	99	100	100	100	100	100
Додекан	86	89	93	96	98	99	100
Пропан-1-ол	100	100	100	100	100	100	100
Этилбензол	94	96	98	98	99	100	100

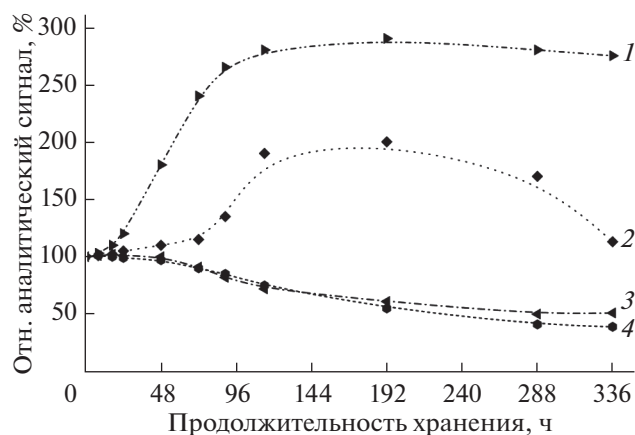


Рис. 2. Зависимость относительного аналитического сигнала от продолжительности хранения пробы выдыхаемого воздуха в мешке: 1 – пропан-1-ол, 2 – гептан, 3 – додекан, 4 – пропионовая кислота.

ношение аналитического сигнала через 24 ч после концентрирования к аналитическому сигналу сразу после концентрирования, выраженное в процентах) для сорбентов Porapak™ P и Porapak™ Q (табл. 3). Транспортировать и хранить пробы целесообразнее в СТ, однако это увеличивает время отбора проб на месте и исключает возможность дальнейших параллельных анализов другими методами.

Сравнение различных типов сорбентов проведено по следующим параметрам: остаточный фон газовой выделений из сорбента, величина аналитического сигнала, конверсия (эффективность цикла сорбция–десорбция), эффективность хранения. Для наполнения СТ выбраны следующие сорбенты: Porapak™ P, Porapak™ Q, Tenax® TA и трехсекционные СТ на основе Tenax® GR, Carborack™ B и Carbosieve® S-III. Количество сорбента ограничено конструкцией пиролизера, а точнее размерами керамического нагревателя печи (объем зоны сорбента $188 \pm 9 \text{ мм}^3$), поэтому сравнение проводили в условиях одинакового объема, а не массы.

По остаточному фону газовой выделений все сорбенты, кроме трехсекционной СТ, являются приемлемыми для исследований (рис. 3). Применение трехсекционной СТ осложнено наличием на хроматограмме пиков артефактов в диапазоне времени удерживания 1.4–2.8 мин, совпадающих с соответствующими величинами компонентов ВВ: 2-метилбута-1,3-диена (1.854 ± 0.024 мин), пропан-2-ола (1.90 ± 0.03 мин), пропан-1-ола (2.14 ± 0.03 мин) и гексана (2.280 ± 0.026 мин).

Величины аналитических сигналов соединений из пробы ВВ добровольца представлены в табл. 3. Для сорбентов Porapak™ P и Porapak™ Q характерны на порядок более высокие величины аналитических сигналов, что обусловлено их высокой гидрофобностью (вода не блокирует активные центры на поверхности сорбента) по сравне-

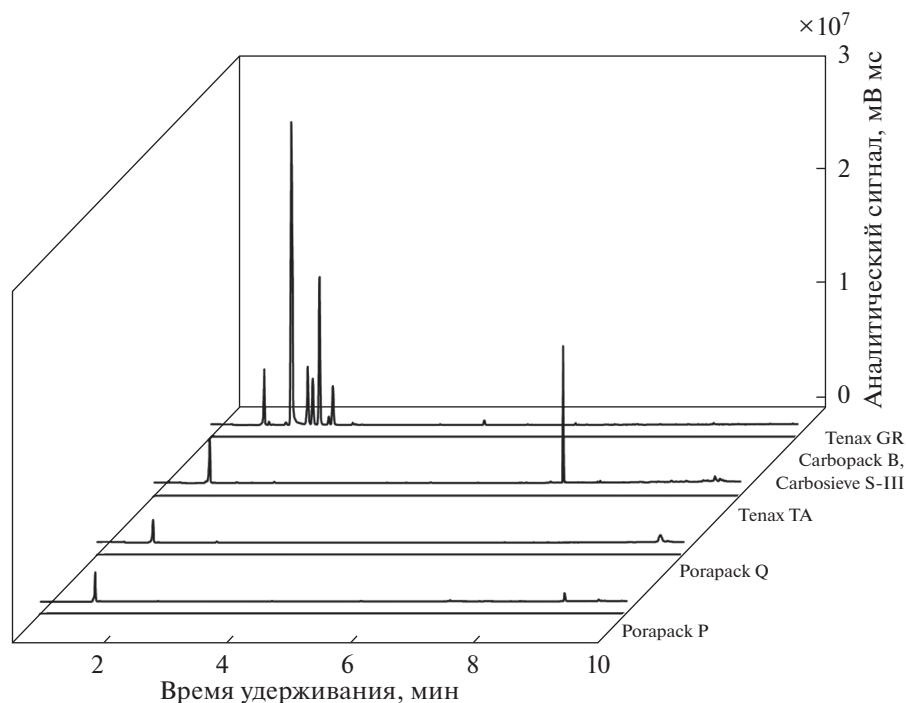


Рис. 3. Остаточный фон газовой выделений из различных сорбентов. Условия хроматографирования приведены в табл. 1.

Таблица 3. Сравнение сорбентов по различным параметрам

Соединение	Porapak™ P	Porapak™ Q	Tenax® TA	Трехсекционная СТ
Эффективность хранения пробы выдыхаемого воздуха в сорбционной трубке в течение 24 ч, %				
Гептан	99	98	100	77
Додекан	100	98	50	50
Октан-1-аль	100	100	100	99
Пропан-1-ол	96	97	100	55
Пропионовая кислота	100	100	63	98
Этилбензол	100	100	100	93
Среднее	99	99	86	79
Аналитические сигналы проб выдыхаемого воздуха, мВ мс				
Гептан	9.0×10^5	4.6×10^5	5.3×10^4	3.5×10^4
Додекан	1.6×10^5	1.5×10^5	9.8×10^4	5.1×10^4
Октан-1-аль	1.9×10^5	9.9×10^4	7.5×10^4	8.0×10^4
Пропан-1-ол	1.7×10^6	2.0×10^6	1.3×10^6	2.2×10^5
Пропионовая кислота	3.3×10^5	4.4×10^5	4.4×10^5	3.9×10^4
Этилбензол	1.1×10^5	8.8×10^4	6.0×10^4	1.8×10^4
Среднее	5.7×10^5	5.4×10^5	3.4×10^5	7.4×10^4
Конверсия, %				
Гептан	99	95	95	98
Додекан	86	55	92	76
Октан-1-аль	84	51	76	78
Пропан-1-ол	98	96	99	93
Пропионовая кислота	100	100	99	95
Этилбензол	98	95	93	98
Среднее	94	82	92	90

Таблица 4. Качественное сравнение сорбентов

Параметр	Porapak™ P	Porapak™ Q	Tenax® TA	Трехсекционная СТ
Эффективность хранения	+	+	–	–
Остаточный фон газовой выделений	+	+	+	–
Величина аналитического сигнала	+	+	–	–
Эффективность сорбции	+	+	+	+
Эффективность десорбции	+	–	+	+
Конверсия	+	–	+	+

нию с Tenax® TA и СТ на основе Tenax® GR, Carborack™ B и Carbosieve® S-III. Таким образом, исходя из величин аналитических сигналов, для решения поставленной задачи наиболее подходят Porapak™ P и Porapak™ Q.

Эффективность цикла сорбция–десорбция ЛОС для различных сорбентов оценивали и сравнивали по обобщенному параметру – конверсии. Результаты расчета конверсии представлены в табл. 3. Видно, что наиболее эффективен сорбент

Porapak™ P. Качественное сравнение сорбентов по всем показателям приведено в табл. 4. По результатам всех проведенных экспериментов выбран сорбент Porapak™ P.

Оптимизация условий определения методом ГХ–МС. Результаты оптимизации объема прокачиваемой пробы через сорбент представлены на рис. 4. Оптимальный объем составил 300 мл при скорости аспирирования 100 мл/мин. Исходя из полученных зависимостей величины аналитиче-

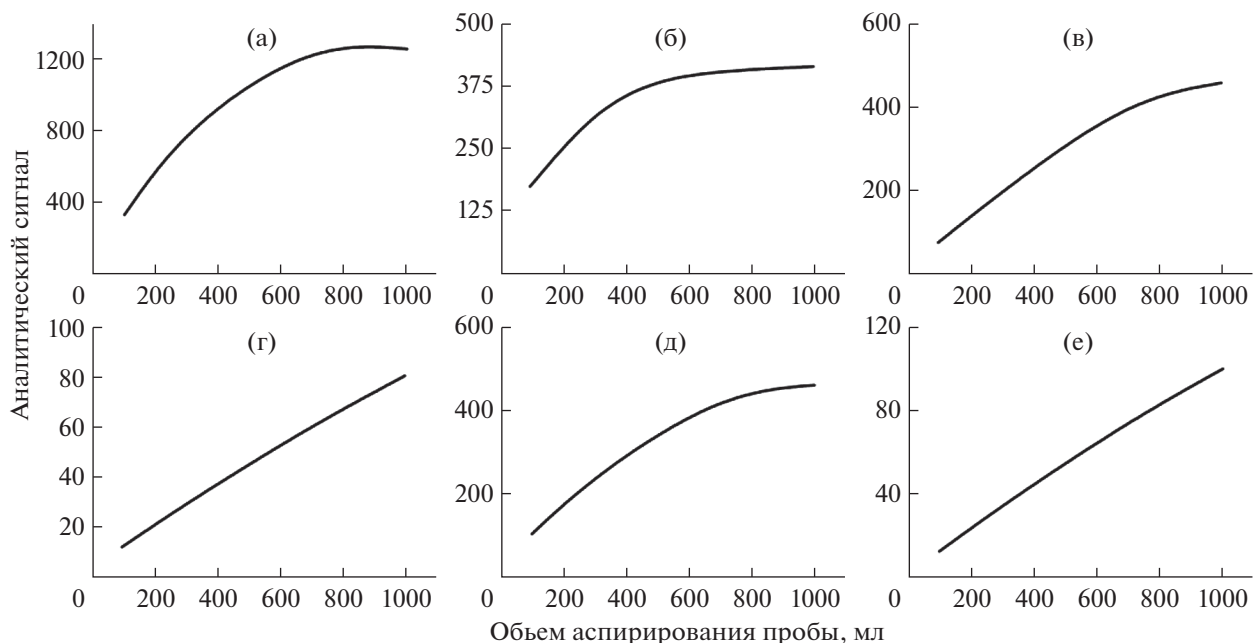


Рис. 4. Зависимость аналитического сигнала от объема прокачиваемой пробы для пропан-1-ола (а), октаналь (б), гептана (в), додекана (г), пропионовой кислоты (д) и 1,3-диметилбензола (е). Концентрации: 1 млн^{-1} по массе (а), (б), 100 млрд^{-1} по массе (в)–(е).

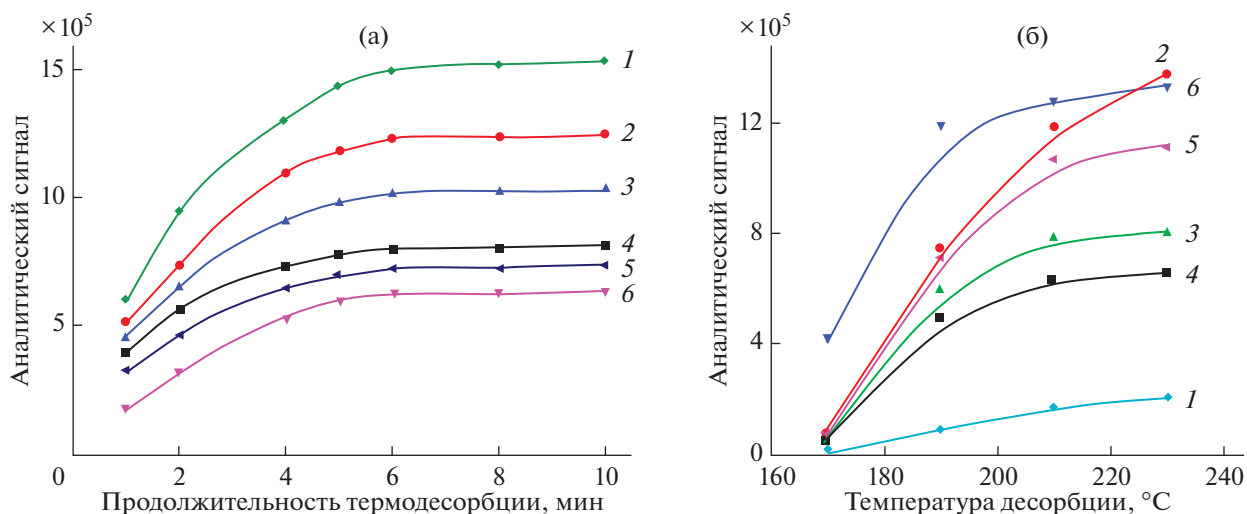


Рис. 5. Зависимость аналитического сигнала от продолжительности (а) и температуры термодесорбции (б): 1 – пропионовая кислота, 2 – додекан, 3 – октаналь, 4 – гептан ($\times 100$), 5 – этилбензол ($\times 10$), 6 – пропан-1-ол ($\times 10$). Условия: температура термодесорбции 210°C (а), продолжительность термодесорбции 5 мин (б).

ского сигнала от времени и температуры термодесорбции (рис. 5), оптимальны время десорбции 5 мин и температура 230°C , но из соображений сохранности сорбента для работы выбрана температура 210°C .

Особенность пробы ВВ заключается в том, что в ней присутствуют компоненты как с высоким содержанием (пропан-2-он, 2-метилбута-1,3-диен, пропан-1-ол, пропан-2-ол) на уровне 100 млрд^{-1} ,

так и с низким – на уровне долей млрд^{-1} (этилбензол, пропионовая кислота и др.). В связи с этим при вводе пробы в капиллярную колонку газового хроматографа использовали компромиссное значение деления потока газа-носителя $1 : 20$, чтобы получить сигналы всех целевых соединений на одной хроматограмме. Если работать без деления потока или с его меньшим значением, то происходит перегрузка детектора и его отклю-

ние, что, в свою очередь, приводит к потере полезных аналитических сигналов. При увеличении деления потока наблюдается ухудшение значимой прецизионности в условиях повторяемости. Типичная хроматограмма ВВ условно здорового добровольца, полученная в оптимизированных условиях пробоотбора, пробоподготовки и определения методом ТД–ГХ–МС, приведена на рис. 6.

Оценка содержания потенциальных маркеров рака легких. Для выбранного набора ЛОС с помощью жидких модельных смесей получены градуировочные зависимости $S = ac + b$, характеристики которых представлены в табл. 5. Проверка статистической значимости коэффициентов b показала, что ими можно пренебречь. Относительное стандартное отклонение s_r для разных компонентов пробы ВВ при работе с модельными смесями варьируется в диапазоне 0.01–0.05, а при работе с реальными пробами ВВ – 0.11–0.30. Это обусловлено сложным составом пробы и влиянием паров воды. Высокие значения s_r отмечаются и другими авторами – в работе [45] получены значения 0.09–0.26.

Результаты оценки содержания ЛОС в пробах ВВ представлены в табл. 6. Разброс значений содержаний компонентов для группы добровольцев довольно большой. Эти отличия носят естественный характер в силу индивидуальных особенностей метаболизма. Подобный разброс наблюдается и в работе [35]. В целом полученные значения концентраций ЛОС в ВВ также соответствуют данным [35].

* * *

Таким образом, рассмотрены возможности применения ГХ–МС-анализа для диагностики рака легких по составу выдыхаемого воздуха; осо-

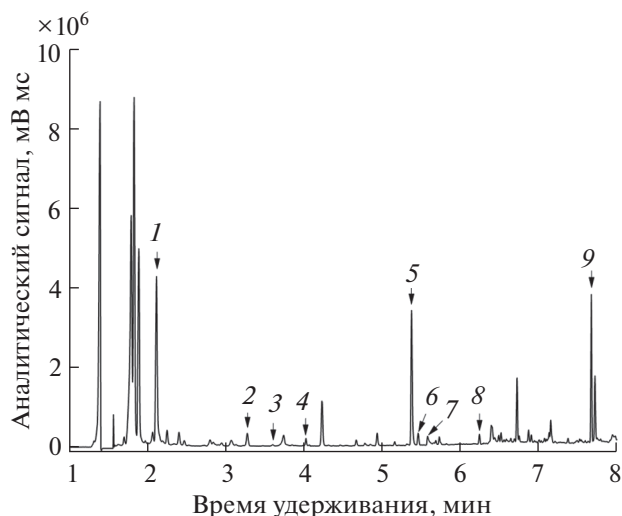


Рис. 6. Типичная хроматограмма пробы выдыхаемого воздуха условно здорового добровольца, полученная в оптимизированных условиях отбора и подготовки проб: 1 – пропан-1-ол, 2 – гептан, 3 – метилциклогексан, 4 – пропионовая кислота, 5 – этилбензол, 6 – 1,3-диметилбензол, 7 – 1,2-диметилбензол, 8 – бензальдегид, 9 – додекан. Условия хроматографического анализа приведены в табл. 1.

бое внимание уделено унификации процедуры отбора и подготовки проб, имеющей ключевое значение для реализации данной задачи. Показано, что разработанную процедуру анализа можно использовать в качестве контрольной методики после валидации.

Исследования проведены с использованием оборудования Научного парка СПбГУ “Методы анализа состава вещества” и “Ресурсного образовательного центра по направлению Химия”. Работа выполнена

Таблица 5. Характеристики уравнения градуировочной зависимости $S = ac + b$ ($n = 13$, $P = 0.95$) для различных соединений и достигнутые пределы обнаружения (сигнал/шум = 3)

Соединение	Коэффициент a	r	c_{\min} , трлн ⁻¹ по массе
1,2-Диметилбензол	$(8.53 \pm 0.08) \times 10^4$	0.999	200
1,3-Диметилбензол	$(8.9 \pm 0.2) \times 10^4$	0.999	200
Бензальдегид	$(4.78 \pm 0.03) \times 10^4$	0.999	100
Гептан	$(1.01 \pm 0.01) \times 10^5$	0.999	30
Додекан	$(1.05 \pm 0.03) \times 10^5$	0.997	500
Метилциклогексан	$(1.101 \pm 0.009) \times 10^5$	0.999	100
Пропан-1-ол	$(1.25 \pm 0.07) \times 10^4$	0.996	100
Пропионовая кислота	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^4$	0.993	700
Этилбензол	$(7.9 \pm 0.1) \times 10^4$	0.997	200

Таблица 6. Медианы концентраций летучих органических соединений (млрд^{-1} , по массе) и размах значений в пробах условно здоровых добровольцев ($n = 16$)

Соединение	Настоящая работа	Работа [36]
1,2-Диметилбензол	20 (3–124)	21 (7–100)
1,3-Диметилбензол	2 (1–8)	3.1 (3.0–3.5)
Бензальдегид	2 (0.8–2.9)	1.8 (1–3.4) [46]
Гептан	6 (1–24)	5 (3–16)
Додекан	3 (0.4–10)	Нет данных
Метилциклогексан	$<c_{\min}$	18.12 нг/л (s_r 1.43) [38]
Пропан-1-ол	29 (1–73)	61 (29–116)
Пропионовая кислота	$<c_{\min}$	Нет данных
Этилбензол	2 (0.9–19)	3 (3–16)

при финансовой поддержке гранта СПбГУ № 12.40.536.2017.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J., Bray F., Steliarova-Foucher E., Forman D. Cancer Incidence in Five Continents, CI5plus. IARC CancerBase, 2014. № 9. 1365 p.
2. Ганеев А., Губаль А., Лукьянов Г., Арсеньев А., Барчук А., Джагацпанян И., Горбунов И., Рассадина А., Немец В., Неведов А., Коротецкий Б., Соловьев Н., Иаковлева Е., Иваненко Н., Кононов А., Sillanpaa M., Seeger Th. Анализ выдыхаемого воздуха как способ диагностики рака легких на ранних стадиях: возможности и проблемы // Успехи химии. 2018. Т. 87. № 9. С. 904. (Ganeev A., Gubal A., Lukyanov G., Arseniev A., Barchuk A., Jahatspanian I., Gorbunov I., Rassadina A., Nemets V., Nefedov A., Korotetsky B., Solovyev N., Iakovleva E., Ivanenko N., Kononov A., Sillanpaa M., Seeger Th. Analysis of exhaled air for early-stage diagnosis of lung cancer: opportunities and challenges // Russ. Chem. Rev. 2018. V. 87. № 9. P. 904.)
3. Mountain C. Revisions in the international system for staging lung cancer // Chest. 1997. V. 111. № 6. P. 1710.
4. Silva C., Cavaco C., Perestrello R., Pereira J., Câmara J. Microextraction by packed sorbent (MEPS) and solid-phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine // Metabolites. 2014. V. 4. № 1. P. 71.
5. Oken M., Marcus P., Hu P., Beck T., Hocking W., Kvale P., Cordes J., Riley T., Winslow S., Peace S., Levin D., Prorok P., Gohagan J. Baseline chest radiograph for lung cancer detection in the randomized prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial // J. Natl. Cancer Inst. 2005. V. 97. № 24. P. 1832.
6. Swensen S., Jett J., Hartman T., Midthun D., Sloan J., Sykes A., Aughenbaugh G., Clemens M. Lung cancer screening with CT: Mayo clinic experience // Radiology. 2003. V. 226. № 3. P. 756.
7. Gouvinhas C., De Mello R., Oliveira D., Castro-Lopes J., Castelo-Branco P., Dos Santos R., Hesperhol V., Pozza D. Lung cancer: A brief review of epidemiology and screening // Future Oncol. 2018. V. 14. № 6. P. 567.
8. Li J., Peng Y., Liu Y., Li W., Jin Y., Tang Z., Duan Y. Investigation of potential breath biomarkers for the early diagnosis of breast cancer using gas chromatography–mass spectrometry // Clin. Chim. Acta. 2014. V. 436. P. 59.
9. Phillips M., Basa-Dalay V., Blais J., Bothamley G., Chaturvedi A., Modi K., Pandya M., Natividad M., Patel U., Ramraje N., Schmitt P., Udwadia Z. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis // Tuberculosis. 2012. V. 92. № 4. P. 314.
10. Smith D., Sovová K., Dryahina K., Doušová T., Dřevínek P., Španěl P. Breath concentration of acetic acid vapour is elevated in patients with cystic fibrosis // J. Breath Res. 2016. V. 10. № 2. 021002.
11. Amal H., Shi D., Ionescu R., Zhang W., Hua Q., Pan Y., Tao L., Liu H., Haick H. Assessment of ovarian cancer conditions from exhaled breath // Int. J. Cancer. 2015. V. 136. № 6. P. E614.
12. Amann A., Miekisch W., Schubert J., Buszewski B., Ligor T., Jezierski T., Pleil J., Risby T. Analysis of exhaled breath for disease detection // Ann. Rev. Anal. Chem. 2014. V. 7. P. 455.
13. Phillips M. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath // Anal. Biochem. 1997. V. 247. № 2. P. 272.
14. Hakim M., Broza Y., Barash O., Peled N., Phillips M., Amann A., Haick H. Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways // Chem. Rev. 2012. V. 112. № 11. P. 5949.
15. McCafferty J., Bradshaw T., Tate S., Greening A., Innes, J. Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations // Thorax. 2004. V. 59. № 8. P. 694.
16. Peled N., Hakim M., Bunn Jr. P., Miller Y., Kennedy T., Mattei J., Mitchell J., Hirsch F., Haick H. Non-invasive breath analysis of pulmonary nodules // J. Thorac. Oncol. 2012. V. 7. № 10. P. 1528.
17. Fuchs P., Loeseken C., Schubert J., Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer // Int. J. Cancer. 2010. V. 126. № 11. P. 2663.
18. Phillips M., Cataneo R., Greenberg J., Gunawardena R., Naidu A., Rahbari-Oskoui F. Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress // J. Lab. Clin. Med. 2000. V. 136. № 3. P. 243.

19. *Phillips M., Herrera J., Krishnan S., Zain M., Greenberg J., Cataneo R.* Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans // *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1999. V. 729. № 1–2. P. 75.
20. *Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Klieber M., Schwarz K., Ligor M., Ligor T., Filipiak W., Denz H., Fiegl M., Hilbe W., Weiss W., Lukas P., Jamnig H., Hackl M., Haidengerger A., Buszewski B., Miekisch W., Schubert J., Amann A.* Non-invasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath // *BMC cancer.* 2009. V. 9. № 1. P. 348.
21. *Fink T., Baumbach J., Kreuer S.* Ion mobility spectrometry in breath research // *J. Breath Res.* 2014. V. 8. № 2. 027104.
22. *Capuano R., Santonico M., Pennazza G., Ghezzi S., Martinelli E., Roscioni C., Lucantoni G., Galluccio G., Paolesse R., Natale C., D'Amico A.* The lung cancer breath signature: a comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lungs // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. 16491.
23. *Dweik R., Amann A.* Exhaled breath analysis: the new frontier in medical testing // *J. Breath Res.* 2008. V. 2. № 3. 030301.
24. *Phillips M.* Breathtaking technology for the detection of *Helicobacter pylori* // *Am. J. Gastroenterol.* 1995. V. 90. № 12. P. 2089.
25. *Amann A., Miekisch W., Pleil J., Risby T., Schubert J.* Volatile organic compounds-7 Methodological issues of sample collection and analysis of exhaled breath // *Eur. Respir. Monogr.* 2010. № 49. P. 96.
26. *Pereira J., Porto-Figueira P., Cavaco C., Taunk K., Rapole S., Dhakne R., Nagarajaram H., Cãmara J.* Breath analysis as a potential and non-invasive frontier in disease diagnosis: an overview // *Metabolites.* 2015. V. 5. № 1. P. 3.
27. *Schmekel B., Winquist F., Vikström A.* Analysis of breath samples for lung cancer survival // *Anal. Chim. Acta.* 2014. V. 840. P. 82.
28. *Phillips C., Syed Y., Mac Parthaláin N., Zwiggelaar R., Claypole T., Lewis K.* Machine learning methods on exhaled volatile organic compounds for distinguishing COPD patients from healthy controls // *J. Breath Res.* 2012. V. 6. № 3. 036003.
29. *Wang C., Ke C., Wang X., Chi C., Guo L., Luo S., Guo Z., Xu G., Zhang F., Li E.* Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath // *Anal. Bioanal. Chem.* 2014. V. 406. № 19. P. 4757.
30. *Захаров А.А., Ильна Н.А.* Анализ микрофлоры ротовой полости обследованных людей с различными заболеваниями // *Успехи совр. естествознания.* 2007. № 12. С. 141.
31. *Матисова Е.В., Крамарь В.С., Климова Т.Н.* Анализ микрофлоры ротовой полости обследованных людей с различными заболеваниями // *Вестн. ВолГМУ.* 2009. № 4(32). С. 80.
32. *Харсеева Г., Тюкавкина С., Сылка О., Лабушкина А.* Микробиоценоз ротовой полости в норме и некоторых патологических состояниях. Санитарная микробиология. Ростов-на-Дону: Изд-во РостГМУ, 2016. 127 с.
33. *Alonso M., Castellanos M., Sanchez J.* Evaluation of potential breath biomarkers for active smoking: assessment of smoking habits // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 396. № 8. P. 2987.
34. *Ligor M., Ligor T., Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Klieber M., Denz H., Fiegl M., Hilbe W., Weiss W., Lukas P., Jamnig H., Hackl M., Buszewski B., Miekisch W., Schubert J., Amann A.* Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2009. V. 47. № 5. P. 550.
35. *Rudnicka J., Walczak M., Kowalkowski T., Jezierski T., Buszewski B.* Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography–mass spectrometry versus trained dogs // *Sens. Actuators B.* 2014. V. 202. P. 615.
36. *Haick H., Broza Y., Mochalski P., Ruzsanyi V., Amann A.* Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 5. P. 1423.
37. *Wenwen L., Yixiang D.* Human exhaled breath analysis trends in techniques and its potential applications in non-invasive clinical diagnosis // *Prog. Chem.* 2015. V. 27. № 4. P. 321.
38. *de Gennaro G., Dragonieri S., Longobardi F., Musti M., Stallone G., Trizio L., Tutino M.* Chemical characterization of exhaled breath to differentiate between patients with malignant pleural mesothelioma from subjects with similar professional asbestos exposure // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. № 7–8. P. 3043.
39. *Poli D., Carbognani P., Corradi M., Goldoni M., Acampa O., Balbi B., Bianchi L., Rusca M., Mutti A.* Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study // *Respir. Res.* 2005. V. 6. № 1. 71.
40. *Amal H., Leja M., Broza Y., Tisch U., Funke K., Liepniece-Karele I., Skapars R., Xu Z., Liu H., Haick H.* Geographical variation in the exhaled volatile organic compounds // *J. Breath Res.* 2013. V. 7. № 4. 047102.
41. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 “Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений”.
42. Методические указания МУК 4.2.3115-13 “Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний”. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 39 с.
43. SUPELCO. Хроматографические продукты, 2005–2006.
44. *Каргин В.А.* Энциклопедия полимеров. Т. 1. М.: Сов. энциклопедия, 1972. С. 436.
45. *Gaspar E., Lucena A., da Costa J., das Neves H.* Organic metabolites in exhaled human breath – a multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. № 14. P. 2749.
46. *Mochalski P., King J., Klieber M., Unterkofler K., Hinterhuber H., Baumann M., Amann A.* Blood and breath levels of selected volatile organic compounds in healthy volunteers // *Analyst.* 2013. V. 138. № 7. P. 2134.