ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2022, том 77, № 10, с. 931–937

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 543.641+543.544.43+543.51

СРАВНЕНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ДЕРИВАТИЗАЦИЕЙ И МИКРОСОРБЦИОННОГО КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ В ШПРИЦЕ (MEPS) ДЛЯ АНАЛИЗА КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

© 2022 г. А. И. Ревельский[a, *], А. С. Козырь[a], А. С. Самохин[a], Э. Х. Анаев[b], И. А. Ревельский[a]

[a] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет Ленинские горы, 1, стр. 3, Москва, ГСП-1, 119991 Россия*

[b] *Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия*

*****e-mail: sorbent@yandex.ru*

Поступила в редакцию 12.01.2022 г.
После доработки 09.03.2022 г.
Принята к публикации 09.03.2022 г.

Проведено сравнение двух подходов к пробоподготовке образцов конденсата выдыхаемого воздуха (**КВВ**) человека (здоровых добровольцев) для обнаружения следов низкомолекулярных органических соединений методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии: лиофилизации с последующей дериватизацией и микросорбционного концентрирования в шприце (micro extraction by packed sorbent, MEPS). В виде силильных производных зарегистрирован ряд жирных, гидрокси-, дикарбоновых кислот, мочевина, в образцах также зафиксирован деканаль. В виде изобутоксикарбониловых эфиров зарегистрированы аланин, глицин, валин, пролин, изолейцин. Микросорбционное концентрирование с применением в качестве сорбента силикагеля с привитыми октадецильными группами позволило зарегистрировать в образцах КВВ ряд жирных кислот, алканов, спиртов, аминов, из альдегидов – деканаль. Примененные подходы к пробоподготовке для обнаружения следов неизвестных низкомолекулярных органических соединений в КВВ подтверждают и дополняют друг друга.

Ключевые слова: конденсат выдыхаемого воздуха, лиофилизация, дериватизация, силилирование, изобутилхлорформиат, микросорбционное концентрирование в шприце (Micro Extraction by Packed Sorbent (MEPS)), газовая хромато-масс-спектрометрия.

DOI: 10.31857/S0044450222100139

Выявление низкомолекулярных органических веществ, отражающих особенности биохимических процессов в организме человека (область метаболомики), представляет научный и практический интерес на протяжении последних двух десятилетий. Результат поиска литературы по базе Web of Science по ключевому слову “metabolomic” показал следующую картину: в начале 2000-х годов встречаются единичные работы, в 2006 г. зарегистрировано более 100 работ, начиная с 2009 г. количество публикаций увеличивается на 100 и более практически каждый год.

Разработке алгоритмов анализа биологических образцов человека, полученных с помощью неинвазивных методик отбора (моча, пот, слюна, выдыхаемых воздух, конденсат выдыхаемого воздуха), на сегодняшний день уделяется большое внимание. В случае метаболомного анализа таких образцов искомые аналиты необходимо определять на следовом уровне на фоне сложной многокомпонентной матрицы. По этой причине для таких образцов применяют высокоселективные и высокочувствительные методы анализа многокомпонентных смесей (хромато-масс-спектрометрию, в частности) в сочетании с эффективными способами пробоподготовки [1].

Анализ выдыхаемого воздуха ограничен летучими органическими соединениями. Он не охватывает многие полярные и нелетучие низкомолекулярные органические вещества, отражающие биохимические процессы в организме человека. Наблюдаются потери определяемых веществ при пробоотборе [2].

Конденсат выдыхаемого воздуха позволяет при проботборе охватить более широкий спектр потенциальных маркеров заболевания (в том числе неорганических, полярных и нелетучих низкомолекулярных органических веществ, высокомо-

лекулярных веществ), но при этом вещества находятся в образце на следовом уровне [3–6].

Рост количества публикаций, отражающих результаты научных исследований образцов конденсата выдыхаемого воздуха, заметен с начала 2000-х годов, начиная с 2008 г. и по настоящее время количество ежегодных публикаций не уменьшается.

В 2005 г. от имени специальной комиссии Американского торакального общества (ATS) и Европейского респираторного общества (ERS) была выпущена статья, в которой представлено руководство по проведению отбора образцов КВВ (и их анализа) с рекомендациями по использованию такого подхода к диагностике и описанием путей дальнейшего развития с целью его стандартизации [7].

Авторы обзора [8] рассмотрели пути развития подхода к диагностике заболеваний, основанного на анализе образцов КВВ, начиная с упомянутой выше статьи с рекомендациями ATS/ERS по 2013 г. Представлено многообразие коммерческих устройств для отбора конденсата выдыхаемого воздуха, среди которых и прибор EcoScreen (производитель “Erich Jaeger”, Германия), с помощью которого отбирали образцы КВВ и в нашем исследовании. Сбор образцов КВВ у каждого пациента или добровольца с помощью этой установки занимает 10–15 мин. Объем каждой пробы составляет от 1.5 до 2.5 мл. При этом акцентируется внимание на хорошей воспроизводимости значений объема отобранных образцов КВВ. Говоря о новых подходах к анализу конденсата выдыхаемого воздуха (в том числе и с точки зрения повышения воспроизводимости результатов), авторы делают акцент на метаболомном анализе.

Стандартизация пробоотбора КВВ и анализа для применения в клинической практике не завершена и дальнейшие исследования представляют интерес [8, 9].

Следует отметить, что в большинстве случаев в КВВ здоровых добровольцев содержание низкомолекулярных органических соединений находится на более низком уровне, чем при патологиях [10].

Как и в случаях других биологических жидкостей, при пробоподготовке КВВ используют жидкостно-жидкостную и твердофазную экстракцию. Авторы публикации [11] сравнили эти два варианта пробоподготовки для анализа образцов КВВ здоровых добровольцев методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (**ГХ-МС**) высокого разрешения. Остатки воды в растворах, полученных после проведения жидкостно-жидкостной экстракции и стадии десорбции твердофазной экстракции, вымораживали. Органическую фазу отделяли. В качестве сорбента для твердофазной экстракции использовали силикагель с привитыми октадецильными группами. Исследовав образцы КВВ 50 здоровых добровольцев с применением обоих методов пробоподготовки, авторы выделили жидкостно-жидкостную экстракцию (обнаружен 51 компонент по сравнению с 39 после применения твердофазной экстракции). В качестве растворителя для экстракции выбран гексан. Среди обнаруженных соединений ряд жирных кислот, фенол, бензиловый спирт, индол, триэтилцитрат, альдегидов не обнаружено.

В работе [12] почти тот же коллектив авторов применил для поиска низкомолекулярных органических соединений в КВВ здоровых волонтеров метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией высокого разрешения. Сравнивали результаты анализа с применением для пробоподготовки твердофазной экстракции на гидрофильном и липофильном (силикагель с октадецильными группами) сорбентах и лиофилизации. Авторам удалось обнаружить 49 соединений, включая аминокислоты, жирные кислоты, амиды, жирные альдегиды, имидазолы, дикарбоновые кислоты, гидроксикислоты. Применение твердофазной экстракции с сорбентом С18 позволило обнаружить в КВВ в два раза больше веществ (22) по сравнению с гидрофильным сорбентом (9) (шесть компонентов совпадают в обеих группах). Наибольшее количество компонентов удалось обнаружить в случае применения для пробоподготовки лиофилизацию образцов КВВ.

При анализе КВВ используют различные варианты миниатюризации методов пробоподготовки. Так, методом твердофазной микроэкстракции (**ТФМЭ**) удалось определить в образцах КВВ здоровых добровольцев нормальные и разветвленные углеводороды, спирты, кетоны, альдегиды, карбоновые кислоты. При этом авторы концентрировали аналиты не только из паровой фазы над образцами КВВ, но и непосредственно из жидкой фазы образов. В последнем случае удалось извлечь большее количество компонентов [13]. ТФМЭ с использованием графен/полианилинового покрытия позволила определить ряд альдегидов в образцах здоровых волонтеров и пациентов с раком легких [14].

Микросорбционное концентрирование в шприце (англ. microextraction by packed sorbent, **MEPS**) – также один из вариантов миниатюризации твердофазной экстракции [15]. Основные особенности метода связаны с количеством сорбента, применяемым для экстракции, и техникой эксперимента пробоподготовки. Обычно для экстракции применяют очень небольшое количество сорбента (до 4 мг), в коммерческом варианте упакованного в герметичный картридж, смонтированный на игле шприца, который, в свою оче-

редь, находится в дозаторе с программируемым управлением (скорость потока образца, количество циклов кондиционирования, сорбции, промывки, элюирования). В отличие от твердофазной экстракции, когда поток жидкого образца (или элюента) проходит в одном направлении (сверху вниз) и однократно, при микросорбционном концентрировании в шприце применяет технику эксперимента, основанную на многократном (около 10 раз) пропускании раствора через сорбент в двух направлениях (вверх и вниз) [16].

Применяя несколько циклов прокачки образца в двух направлениях, удается повысить степень извлечения следов аналитов из образца. Благодаря малому количеству сорбента и правильному подбору состава элюента компоненты матрицы при этом незначительно задерживаются на сорбенте (сорбент регенерируется между анализами), что позволяет использовать иглу с картриджем многократно. Малое количество сорбента дает возможность значительно, до десятков микролитров, уменьшить количество элюента при десорбции, что, в свою очередь, не только значительно уменьшает разбавление пробы, но и позволяет ввести десорбированные аналиты непосредственно в кран-дозатор жидкостного хроматографа или в инжектор с программированием температуры газового хроматографа. Коммерчески доступны иглы с картриджами с широким спектром сорбентов, список которых постоянно пополняется. MEPS успешно используют для анализа водных матриц и различных биологических жидкостей, таких как моча, плазма, сыворотка, слюна и кровь. Литературные данные по анализу конденсата выдыхаемого воздуха с использованием MEPS нами не обнаружены.

Цель данной работы – сравнение методов пробоподготовки образцов КВВ здоровых волонтеров для обнаружения низкомолекулярных органических веществ методом ГХ-МС. Сравнивали лиофилизацию с последующей дериватизацией (в качестве реагентов использовали бис(триметилсилил)трифторацетамид-N,O (**БСТФА**) и изобутилхлорформиат) и микросорбционное концентрирование в шприце (MEPS).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы КВВ отбирали с помощью установки ECoScreen (Jaeger, Würzburg, Германия) у здоровых добровольцев с нормальными показаниями функции легких, с отсутствием в анамнезе указаний на атопию, хронические заболевания легких, других органов и систем, а также с отсутствием острых респираторных симптомов в течении последних двух месяцев. Отобранный конденсат переливали в стеклянные виалы объемом 1.5 по 1 мл и замораживали. Исследовали образцы восьми добровольцев (по три-четыре образца для каждого). Аликвоты образцов, пробоподготовка которых была основана на дериватизации, лиофилизировали. Силилирование сухого остатка образцов КВВ после лиофилизации проводили, добавляя 50 мкл БСТФА и выдерживая реакционную смесь при 80°С в течение 30 мин. Далее раствор остужали, упаривали в токе азота и добавляли 50 мкл метил-*трет*-бутилового эфира. При другом варианте дириватизации к образцам КВВ после лиофильной сушки последовательно добавляли 50 мкл ацетонитрила, 2 мкл пиридина и 1 мкл изобутилхлорформиата. Условия взяты из работы [17], в которой изучали дериватизацию жирных кислот [17]. Реакция проходила при комнатной температуре в течение минуты.

Микросорбционное концентрирование в шприце проводили с помощью электронного дозатора MEPS-eVol с возможностью программирования условий работы (SGE Analytical Science, Австралия). В дозатор вставляли стеклянный шприц для проведения микросорбционного концентрирования объемом 50 мкл (SGE Analytical Science, Австралия), к шприцу подсоединяли сменные иглы с встроенными картриджами с сорбентом (силикагель с привитой фазой С18). Размер частиц силикагеля – 45 мкм, размер пор – 60 Å. Масса сорбента – 4 мг (SGE Analytical Science, Австралия). До отбора образцов КВВ сорбент кондиционировали, пропуская в обоих направлениях последовательно метанол, дистиллированную воду, 0.1%-ную муравьиную кислоту (3 × 50 мкл, скорость – 900 мкл/мин для каждого их растворителей). Выбирая условия сорбции и десорбции, отталкивались от результатов нашего исследования [18] более сложных с точки зрения матрицы образцов сыворотки крови.

Анализировали аликвоты образцов КВВ здоровых добровольцев объемом 300 мкл. На стадии сорбции пропускали через картридж с сорбентом в обе стороны аликвоты образца, равные 50 мкл (объем шприца), 15 раз со скоростью 300 мкл/мин. Далее сорбент промывали 1%-ной муравьиной кислоты (два раза по 20 мкл, скорость 500 мкл/мин). На следующей стадии высушивали сорбент, прокачивая через него воздух (20 раз по 50 мкл, скорость 900 мкл/мин). Десорбировали аналиты диэтиловым эфиром (пять раз по 20 мкл, скорость 600 мкл/мин). Упаривали полученный раствор до 50 мкл в токе азота.

Все последовательности действий с образцами КВВ при сравниваемых вариантах пробоподготовки, повторяли для холостого опыта (дистиллированная вода).

Растворы реакционных смесей после проведения реакций дериватизации и элюаты после стадии десорбции микросорбционного концентрирования анализировали с помощью газового хроматографа (7890A, Agilent), соединенного с

времяпролетным масс-спектрометром Pegasus HT (GC-TOFMS – LECO Corporation). Объем анализируемой пробы составлял 1 мкл. Ввод пробы осуществляли в режиме с делением/без деления потока в инжектор, нагретый до 250°С. Делитель потока открывался через 30 с после ввода пробы в инжектор. Вещества разделяли на колонке VF-5ms длиной 30 м, внутренним диаметром 0.25 мм, толщиной неподвижной фазы (5% фенил-, 95% метилполисилоксан) 0.25 мкм в режиме программирования температуры (изотерма 50°С (5 мин), нагревание термостата со скоростью 10 °С/мин до 250°С (изотерма 10 мин)). Скорость потока газа-носителя гелия 1 мл/мин. Аналитические сигналы регистрировали в режиме полного ионного тока, энергия электронов 70 еВ. Диапазон сканирования – от 50 до 600 а.е.м.. Масс-спектры обнаруженных компонентов сравнивали с библиотечными (NIST).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дериватизацию сухого остатка образцов КВВ применили с целью расширения потенциального перечня аналитов, определяемых методом ГХ-МС, и снижения пределов их обнаружения. Наряду с широко используемым силилированием продуктов лиофилизации использовали реакцию с изобутилхлорформиатом. Обычно хлорформиаты применяют для дериватизации аналитов по аминным и карбоксильным группам в водной среде. Примеров применения таких реагентов для дериватизации продуктов лиофилизации КВВ в литературе не обнаружено. Базируясь на условиях дериватизации жирных кислот в безводной среде [17], провели пробоподготовку лиофилизатов образцов КВВ с применением изобутилхлоформиата. В виде N-изобутоксикарбонил-, изобутиловых эфиров и изобутиловых эфиров обнаружили ряд полярных соединений, включающий жирные, дикарбоновые и аминокислоты (табл. 1), а в недериватизированном виде – деканаль.

В виде силильных производных зарегистрировали бензойную кислоту, мочевину, жирные, дикарбоновые и гидроксикислоты (табл. 1). Также обнаружили деканаль.

С помощью микросорбционного концентрирования в шприце с применением миллиграммовых количеств силикагеля с привитыми октадецильными группами в образцах КВВ здоровых добровольцев обнаружили ряд среднелетучих органических соединений (**СЛОС**).

Разделение термостабильных низкомолекулярных органических соединений на летучие и среднелетучие условно и связано с их температурами кипения. Летучие органические соединения легко испаряются при нормальных условиях. Нижняя граница температур кипения среднелетучих органических соединений отличается в разных источниках. От чуть больше 100°С (например, пиридин – 115.6°С) [19] до 250°С [20].

СЛОС характеризуют и давлением паров при температуре окружающей среды. Диапазоны значений давлений паров веществ, относимых к СЛОС, представленные в различных источниках, также отличаются: от 10 до 10^{-6} (10^{-9}) Па [21, 22]; от 10^{-1} (10^{-2}) до 10^{-6} Па [23, 24].

С точки зрения техники эксперимента причина, по которой термостабильные низкомолекулярные органические вещества делят на летучие и среднелетучие, связана с толщиной неподвижной фазы капиллярных колонок, используемых для разделения соединений. Для летучих органических соединений это обычно микрометры (1.0–3.0), для среднелетучих – доли микрометра (0.1–0.25). В данном исследовании использовали колонку, на которой эффективно и селективно разделяют и СЛОС, и производные нелетучих низкомолекулярных органических соединений.

В перечень среднелетучих органических соединений, выделенных с помощью микросорбционного концентрирования в шприце, попали жирные кислоты, фенол, деканол, бензиловый спирт и деканаль. Зарегистрировали ряд веществ экзогенного происхождения.

Обнаруженные среднелетучие органические соединения различной полярности и нелетучие органические соединения представлены в табл. 1. В таблицу внесены только те вещества, которые обнаружили у всех волонтеров. Отношение сигнал/шум для хроматографических пиков выбранных веществ составляло не менее 100/1. Различия в содержании от образца к образцу не учитывали, так как на данном этапе исследования проводили только качественный анализ и при указанном соотношении сигнал/шум коэффициент разбавления аналитов в образцах КВВ не должен был влиять на их обнаружение.

Как видно из табл. 1, рассмотренные методы пробоподготовки дополняют друг друга. Большинство обнаруженных соединений согласно литературным данным входит в перечень веществ, идентифицированных в образцах КВВ здоровых добровольцев с применением газовой хроматомасс-спектрометрии высокого разрешения [11]. При этом ряд полярных соединений, в том числе дикарбоновые, гидроксикислоты, аминокислоты, обнаруженные в нашем исследовании, расширяют этот список. Сравниваемые варианты пробоподготовки позволили также обнаружить в КВВ деканаль.

Обычно при сочетании пробоподготовки, результатом которой является раствор органических веществ, и газовой хроматографии в инжектор хроматографа вводят количество аналитов, содержащихся в 1–2 мкл экстракта. В нашем

Таблица 1. Сравнение результатов анализа образцов конденсата выделяемого воздуха здоровых волонтеров методом газовой хромато-масс-спектрометрии с применением различных вариантов пробоподготовки

№	Обнаруженное вещество	Лиофилизация, БСТФА*	Лиофилизация, изобутилхлорформиат**	MEPS
1	Фенол	–	–	+
2	Гексановая кислота	–	+	–
3	3-Гидроксибутановая кислота	+	–	–
4	Гептановая кислота	+	+	+
5	2-Гидроксипентановая кислота	+	–	–
6	Деканаль	+	+	+
7	Мочевина, N,N’	+	–	–
8	Бензойная кислота	+	+	–
9	Октановая кислота	+	+	+
10	Бутандиовая кислота	+	+	+
11	Бензиловый спирт	–	–	+
12	Нонановая кислота	+	+	+
13	Декановая кислота	+	+	–
14	2-Гидроксиоктановая кислота	+	–	–
15	Аланин	–	+	–
16	Глицин	–	+	–
17	Валин	–	+	–
18	Пролин	–	+	–
19	Изолейцин	–	+	–
20	Гександиовая кислота	+	+	–
21	Додекановая кислота	+	–	+
22	Деканол	–	–	+
23	Гептандиовая кислота	–	+	–
24	Октандиовая кислота	–	+	–
25	Нонандиовая кислота	+	+	–
26	Гексадекановая кислота	+	+	–

* Вещества зарегистрированы в виде триметилсиловых эфиров (за исключением деканаля); ** вещества зарегистрированы в виде N-изобутоксикарбонил-, изобутиловых эфиров (аминокислоты) и изобутиловых эфиров (за исключением деканаля).

предыдущем исследовании [25] мы вводили в инжектор количество аналитов, содержащихся в 100 мкл органического раствора, полученного в результате жидкостно–жидкостной экстракции из образцов КВВ, используя один из вариантов ввода больших по объему проб (large volume injection). Аналиты вводили в инжектор ГХ посредством термодесорбции после предварительного удаления растворителя. Такой вариант ввода пробы заметно снижал предел обнаружения и увеличивал возможность обнаружения большего числа среднелетучих органических веществ в образцах по сравнению с вводом 1 мкл экстракта. Результаты получили для 10 образцов КВВ здоровых волонтеров. При такой технике ввода пробы в образцах здоровых добровольцев обнаружили ряд жирных кислот от гексановой до октадекановой. При этом содержание тех жирных кислот, которые удалось зарегистрировать в настоящей работе (от гексановой до декановой, додекановая и гексадекановая), было заметно выше остальных. В результате обоих исследований обнаружены фенол, деканаль, деканол, бензиловый спирт.

Это сравнение показывает перспективность сочетания MEPS с коммерческим вариантом ввода больших по объему проб в инжектор газового хроматографа с программированием температуры для обнаружения СЛОС.

Заметим, что возможность варьирования сорбентов в этом методе позволит охватить более широкий спектр следовых количеств низкомолекулярных органических соединений различной полярности. Вероятно, достоинства этого метода концентрирования проявятся и при целевом анализе биомаркеров.

* * *

Применение двух вариантов пробоподготовки образцов КВВ здоровых добровольцев (дериватизации лиофилизатов образцов и микросорбционного концентрирования в шприце (MEPS)) для ГХ-МС-анализа позволило обнаружить 26 низкомолекулярных среднелетучих и нелетучих органических соединений. Метод микросорбционного концентрирования в шприце впервые применен для анализа КВВ, миллиграммовые количества наиболее распространенного сорбента для обычной твердофазной экстракции – силикагеля с привитыми октадецильными группами – позволили выделить и сконцентрировать ряд среднелетучих органических соединений, характерных для КВВ здоровых добровольцев. Представляет интерес дальнейшее исследование КВВ с применением рассмотренных вариантов пробоподготовки, но с использованием инжектора с программированием температуры для ввода больших по объему проб в ГХ-МС и более современного оборудования с пределом детектирования на уровне десятков фемтограмм.

Исследование было выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-03-00894.

Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Maniscalco M., Paris D., Melck D.J., Molino A., Fuschillo S., Motta A.* Metabolomics of exhaled breath condensate by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry: A methodological approach // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. P. 2381. https://doi.org/10.2174/0929867325666181008122749
2. *Prado C., Marín P., Periago J.F.* Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry to the determination of volatile organic compounds in end-exhaled breath samples // J. Chromatogr. A. 2003. V. 1011. № 1–2. P. 125. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01103-8
3. *Анаев Э.Х., Чучалин А.Г.* Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор зарубежной литературы) // Пульмонология. 2002. № 2. С. 57.
4. *Quimbar M.E., Davis S.Q., Al-Farra S.T., Hayes A., Jovic V., Masuda M., Lippert A.R.* Chemiluminescent measurement of hydrogen peroxide in the exhaled breath condensate of healthy and asthmatic adults // Anal. Chem. 2020. V. 92. P. 14594. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02929
5. *Rahimpour E., Khoubnasabjafari M., Jouyban-Gharamaleki V., Jouyban A.* Non-volatile compounds in exhaled breath condensate: Review of methodological aspects // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. P. 6411. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1259-4
6. *Hayes S.A., Haefliger S., Harris B., Pavlakis N., Clarke S.J., Molloy M.P., Howell V.M.* Exhaled breath condensate for lung cancer protein analysis: A review of methods and biomarkers // J. Breath Res. 2016. V. 10. Article 034001. https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/3/034001
7. *Horváth I., Hunt J., Barnes P.J.* Exhaled breath condensate: Methodological recommendations and unresolved questions // Euro. Respir. J. 2005. V. 26. P. 523. https://doi.org/10.1183/09031936.05.00029705
8. *Ahmadzai H., Huang S., Hettiarachchi R., Lin J.L., Thomas P.S., Zhang Q.* Exhaled breath condensate: A comprehensive update // Clin. Chem. Lab. Med. 2013. V. 51. P. 1343. https://doi.org/10.1515/cclm-2012-05939
9. *Połomska J., Bar K., Soza'nska B.* Exhaled breath condensate — A non-invasive approach for diagnostic methods in asthma // J. Clin. Med. 2021. V. 10. Article 2697. https://doi.org/10.3390/jcm10122697
10. *Konstantinidi E.M., Lappas A.S., Tzortzi A.S., Behrakis P.K.* Exhaled breath condensate: Technical and diagnostic aspects // Sci. World J. 2015. Article 435160. https://doi.org/10.1155/2015/435160
11. *Peralbo-Molina A., Calderón-Santiago M., Priego-Capote F., Jurado-Gámez B., Luque de Castro M.D.* Development of a method for metabolomic analysis of human exhaled breath condensate by gas chromatography–mass spectrometry in high resolution mode // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 887. P. 118. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.008
12. *Fernández-Peralbo M.A., Calderón Santiago M., Priego-Capote F., Luque de Castro M.D.* Study of exhaled breath condensate sample preparation for metabolomics analysis by LC–MS/MS in high resolution mode // Talanta. 2015. V. 144. P. 1360. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.010
13. *Aksenov A.A., Zamuruyev K.O., Pasamontes A., Brown J.F., Schivo M., Foutouhi S., Weimer B.C., Kenyon N.J., Davis C.E.* Analytical methodologies for broad metabolite coverage of exhaled breath condensate // J. Chromatogr. B. 2017. V. 1061–1062. P. 17. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.06.038
14. *Xu Y.L.H.* Development of a novel graphene/polyaniline electrodeposited coating for on-line in-tube solid phase microextraction of aldehydes in human exhaled breath condensate // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1395. C. 35. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.058
15. *Yang L., Said R., Abdel-Rehim M.* Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review // J. Chromatogr. B. 2017. V. 1043. P. 33
16. *Moein M.M., Abdel-Rehim A., Abdel-Rehim M.* Microextraction by packed sorbent (MEPS) // Trends Anal. Chem. 2015. V. 67. P. 34. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003
17. *Hušek P., Rijks J.A., Leclercq P.A., Cramers C.A.* Fast esterification of fatty acids with alkyl chloroformates. Optimization and application in gas chromatography // J. High Resolut. Chromatogr. 1990. V. 13. P. 633. https://doi.org/10.1002/jhrc.1240130910

18. *Pautova A.K., Sobolev P.D., Revelsky A.I.* Analysis of phenylcarboxylic acid-type microbial metabolites by microextraction by packed sorbent from blood serum followed by GC–MS detection // Clin. Mass Spectrom. 2019. V. 14 (A). P. 46. https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.05.005

19. EPA, Method 8270 https://www.epa.gov/sites/default/files/2020-10/documents/method_8270e_update_vi_06-2018_0.pdf (26.05.2022).

20. EPA, Technical Overview of Volatile Organic Compounds, https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/technical-overview-volatile-organic-compounds (26.05. 2022).

21. *Bidleman T.F.* Atmospheric processes: Wet and dry deposition of organic compounds are controlled by their vapor-particle partitioning // Environ. Sci. Technol. 1988. V. 22. P. 361. https://doi.org/10.1021/es00169a002

22. *Weschler C.J., Nazaroff W.W.* Semivolatile organic compounds in indoor environments // Atmos. Environ. 2008. V. 42. P. 9018. https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.052

23. *Wania F., Shunthirasingham C.* Passive air sampling for semi-volatile organic chemicals // Environ. Sci.: Processes Impacts. 2020. V. 22. P. 1925. https://doi.org/10.1039/D0EM00194E

24. *Cousins I.T., Beck A.J., Jones K.C.* A review of the processes involved in the exchange of semi-volatile organic compounds (SVOC) across the air–soil interface // Sci. Total Environ. 1999. V. 288. P. 5. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00015-7

25. *Родионов А.А., Ревельский А.И., Ревельский И.А., Анохина Т.Н., Анаев Э.Х.* Хроматомасс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха // Масс-спектрометрия. 2007. Т. 4. № 2. С. 143. (*Rodionov A.A., Revelsky A.I., Revelsky I.A., Anokhina T.N., Anaev E.Kh.* Determination of semivolatile organic compounds in exhaled breath condensate by gas chromatography–mass spectrometry // J. Anal. Chem. 2014. V. 69. № 14. P. 1330.) https://doi.org/10.1134/S1061934814140081