

**INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
Polskiej Akademii Nauk
ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków**

www.ifj.edu.pl/publ/reports/2012/

Kraków, grudzień 2012

Raport Nr 2055/Ch

**Zarys metod analitycznych w badaniach oddechu
dla celów diagnostyki medycznej**

Monika Skowron, Beata Grabowska-Polanowska,
Jacek Faber, Ireneusz Śliwka

Streszczenie

Postęp techniczny, ostatnich kilkudziesięciu lat, stworzył możliwość rozwoju szybkich i precyzyjnych metod analitycznych. Pożądane są metody, które umożliwiają równoczesne oznaczenie dużej ilości związków należących do różnych grup chemicznych, uzyskanie ich optymalnego rozdzielania w jak najkrótszym czasie oraz oznaczanie analitów na niskim poziomie stężeń (ppb, ppt - *ang. part per billion, trillion*). Szczególnie wysokie wymagania, co do jakości wykonywanych badań analitycznych, stawia współczesna medycyna. W celach diagnostycznych i badawczych, próbuje się oznaczać śladowe ilości substancji w złożonych matrycach, takich jak krew, moczu. Badania ostatnich lat wskazują, że również wydychane przez człowieka powietrze może się stać przydatnym materiałem analitycznym. Rozwój metod analitycznych, a szczególnie chromatografii gazowej pozwolił na oznaczenie kilkuset substancji w wydychanym powietrzu na poziomie śladów. Część wykrywanych substancji jest generowanych w procesach metabolicznych. Zmiana ich stężenia może dostarczyć wielu informacji o prawidłowości lub zaburzeniu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie. Badania związane z oceną składu wydychanego powietrza zmierzają do znalezienia w wydychanym przez człowieka powietrzu, biomarkerów - charakterystycznych substancji, pomocnych w diagnozowaniu takich schorzeń, jak: cukrzyca, choroby nerek, czy nowotwory. Dodatkowo analiza oddechu może dostarczyć informacji o stosowanych lekach, używkach, czy rodzaju diety. Niniejsza praca stanowi przegląd nowoczesnych technik analitycznych, mających zastosowanie w analizie oddechu. Metodami tymi są: chromatografia gazowa (GC), chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS), spektroskopia laserowa, spektrometria mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR/MS - *ang. Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry*), spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT-MS - *ang. Selected Ion Flow - Tube Mass Spectrometry*) oraz spektrometria ruchliwości jonów (IMS - *ang. Ion Mobility Spectrometry*).

Summary

During the last few years, as a result of technological evolution, the opportunity to develop efficient and accurate methods of analysis has emerged. There's a need for methods allowing simultaneous determination of large amounts of compounds belonging to different chemical groups, obtaining their optimum separation in possibly shortest period of time as well as determination of analytes at low-level concentrations (ppb, ppt - called part per billion, trillion). High demands on the quality of analysis are put by modern medicine. For the diagnostic and exploratory purposes attempts to indicate trace amounts of complex matrices such as blood and urine are taken. Recent years' studies show that the air exhaled by humans may become useful analytical material. Development of analytical methods, especially gas chromatography allowed the identification of several hundred kinds of substances in the exhaled air at trace level. Some of the detected substances are generated in metabolic processes. Concentration changes can provide lots of information confirming valid or invalid biochemical processes taking place in the human body. Research related to assessment of the air composition of the human breath tends to find biomarkers - specific substances useful in the diagnosis of diseases such as diabetes, kidney disease and cancer. In addition to that, breath analysis can provide information about medicines and taken drugs or diet type. This overview of modern, analytical techniques applicable to the breath analysis includes gas chromatography (GC), gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), laser spectroscopy, mass spectrometry with ionization by proton transfer (PTR-MS - Proton Transfer Reaction - Mass Spectrometry), mass spectrometry ionization in selected ion flow (SIFT-MS - Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry) and ion mobility spectrometry (IMS)

Spis treści

1. WPROWADZENIE	4
1.1. Cel i zakres pracy	5
2. RYS HISTORYCZNY	6
3. CHARAKTERYSTYKA WYDYCHANEGO POWIETRZA	7
3.1. Charakterystyka i skład wydychanego powietrza	7
3.2. Skład powietrza atmosferycznego i powietrza wydychanego	9
4. POTENCJALNE MARKERY ODDECHOWE	10
5. TECHNICZNE I METODYCZNE ASPEKTY ANALIZY ODDECHU	11
5.1. Pobieranie próbek wydychanego powietrza	11
5.2. Metody wzbogacania próbek gazów oddechowych	14
5.2.1. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej	14
5.2.2. Termiczna desorpcja	17
6. METODY ANALIZY GAZÓW ODDECHOWYCH	19
6.1. Chromatografia gazowa z różnym systemem detekcji	19
6.1.1. Detektor płomieniowo – jonizacyjny	21
6.1.2. Detektor płomieniowo – fotometryczny	21
6.1.3. Detektor wychwyty elektronów	23
6.2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas	23
6.2.2. Spektrometria mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR/MS)	26
6.2.3. Spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT/MS)	28
6.2.4. Spektrometria ruchliwości jonów (IMS)	30
6.4. Spektroskopia laserowa	31
6.3. Elektroniczne nosy	31
7. UKŁAD POMIAROWY STOSOWANY W BADANIACH ODDECHU W IFJ PAN	33
8. PODSUMOWANIE	37
9. LITERATURA	39

1. WPROWADZENIE

W ostatnim dziesięcioleciu nastąpiło ogromne zainteresowanie środowisk naukowych i medycznych badaniami nad opracowaniem nieinwazyjnych metod diagnozowania stanów chorobowych z wykorzystaniem biomarkerów. Rozwinęła się dziedzina nauki - metabolomika dotycząca poznania metabolomu, czyli wszystkich metabolitów powstających w organizmie ludzkim. Dzięki zidentyfikowaniu biomarkera i określeniu jego stężenia w takich próbkach biologicznych jak ślina, mocz, czy wydychane powietrze, możliwa jest ocena stanu zdrowia osoby badanej.

Obiecującym narzędziem diagnostycznym, które pozwoli na wczesne, nieinwazyjne wykrycie wielu schorzeń, wydają się być testy oddechowe, opierające się na chromatograficznej analizie składu wydychanego powietrza. Substancje powstające podczas różnych procesów biochemicznych zachodzących w żywym organizmie (substancje endogenne), przedostają się do krwi, a następnie są uwalniane w płucach. Umiejętność detekcji endogennych substancji w wydychanym powietrzu może dostarczyć cennych informacji o prawidłowości lub zaburzeniu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie. Z analizy oddechu dodatkowo można uzyskać informacje o stosowanych lekach, używkach, czy rodzaju stosowanej diety.

Analiza oddechu, posiada wiele zalet, jest szybka, nieinwazyjna, bezbolesna, a samo pobranie próbki jest bezpieczne i wygodne zarówno dla pacjenta, jak i personelu. Test oddechowy może stać się wygodnym narzędziem diagnostycznym pozwalającym oszczędzić pacjentom dyskomfortu wiążącego się z zastosowaniem typowych metod inwazyjnych oraz dać stosunkowo szybką odpowiedź o istnieniu danego schorzeniu.

W ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwuje się ciągły wzrost zainteresowań badaniami nad lotnymi związkami organicznymi zawartymi w oddechu oraz wykorzystaniem ich, jako potencjalnych biomarkerów różnych schorzeń. Wynika to z rozwoju chemii analitycznej, w szczególności chromatografii gazowej (GC) i spektrometrii mas (MS) oraz metod wzbogacania analitów, które umożliwiają identyfikację coraz większej liczby składników, na coraz niższym poziomie stężeń, w coraz bardziej złożonych matrycach i w coraz krótszym czasie. Zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych, takich, jak: chromatografia gazowa (GC), chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS), spektroskopia laserowa, spektrometria mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR/MS), spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT/MS) oraz

spektrometria ruchliwości jonów (IMS), pozwalają na identyfikację substancji organicznych i nieorganicznych w wydychanym powietrzu.

W wyniku badań nad składem wydychanego powietrza, wskazano substancje, których obecność lub zmiana stężenia może świadczyć o istnieniu określonych jednostek chorobowych (np. cukrzyca, astma czy przewlekła choroba nerek). Niestety tylko w przypadku niektórych wykrywanych substancji określono jednoznacznie metaboliczny szlak ich powstawania (aceton, izopren).

Analiza substancji występujących w powietrzu wydychanym przez osoby ze zdiagnozowanymi jednostkami chorobowymi porównana ze składem powietrza u zdrowych osób, poparta analizami statystycznymi, ma na celu wyselekcjonowanie potencjalnych biomarkerów schorzeń.

Być może już wkrótce testowanie wydychanego powietrza, stanie się niedrogim, dogodnym i masowo wykonywanym badaniem, które pomoże lekarzom w rozpoznaniu wielu chorób w ich początkowych stadiach, co zwiększy szansę szybszego powrotu do zdrowia i uniknięcia powikłań.

1.1. Cel i zakres pracy

Przedmiotem pracy jest pokazanie praktycznych aspektów zastosowania testów oddechowych w diagnostyce medycznej przy użyciu różnorodnych metod analitycznych.

Praca obejmuje następujące zagadnienia:

- Skład wydychanego powietrza
- Potencjalne źródła endogennych substancji zawartych w oddechu
- Techniczne i metodyczne aspekty analizy oddechu
- Omówienie technik analitycznych stosowanych w analizie wydychanego powietrza
- Perspektywy rozwoju badań wydychanego powietrza
- Badania własne - wyniki

2. RYS HISTORYCZNY

Zagadnienia analizy wydychanego powietrza przyciągnęły uwagę naukowców ponad 200 lat temu. Antoine Laurent Lavoisier, uważany za ojca „rewolucji chemii” był pionierem badań nad procesami oddychania [1].

W roku 1784 Lavoisier i Pierre Simon Laplace analizując proces oddychania świnki morskiej, stwierdzili, że zwierzę wdychało tlen, a wydychało dwutlenek węgla. Lavoisier skonstruował zatrzymującą wydychane powietrze „pułapkę”, którą stanowił „pewien roztwór chemiczny” (woda wapienna), do którego badana osoba wdmuchiwała powietrze. A. Nebelthau, lekarz z Marburga, był jednym z pierwszych badaczy, którzy wykorzystali analizę kolorymetryczną, do analizy składu powietrza wydychanego przez osoby chore na cukrzycę. Przepuszczając wydychane powietrze przez „pułapkę” jodową (reakcja jodoformowa), Nebelthau, zaobserwował szybką i intensywną zmianę zabarwienia, co świadczyło o tym, że w wydychanym przez pacjenta powietrzu, były większe niż zazwyczaj ilości acetonu.

W 1874 roku, brytyjski neurolog Francis E. Anstie, jako pierwszy, zastosował kolorymetryczną analizę do badania przemian alkoholu w organizmie człowieka [1]. Pierwsze wzmianki związane z analizą składu wydychanego powietrza, pochodzą z przełomu lat 60 i 70, kiedy to następował rozwój chemii analitycznej, w tym głównie technik chromatograficznych. Chromatografię zapoczątkował rosyjski uczoney M. S. Cwiet, publikując w 1904 r. wykonaną w Warszawie pracę o rozdzielaniu naturalnych barwników organicznych na kolumnie wypełnionej węglanem wapnia. Dziś metody chromatograficzne stanowią jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod rozdzielania mieszanin w toku analizy.

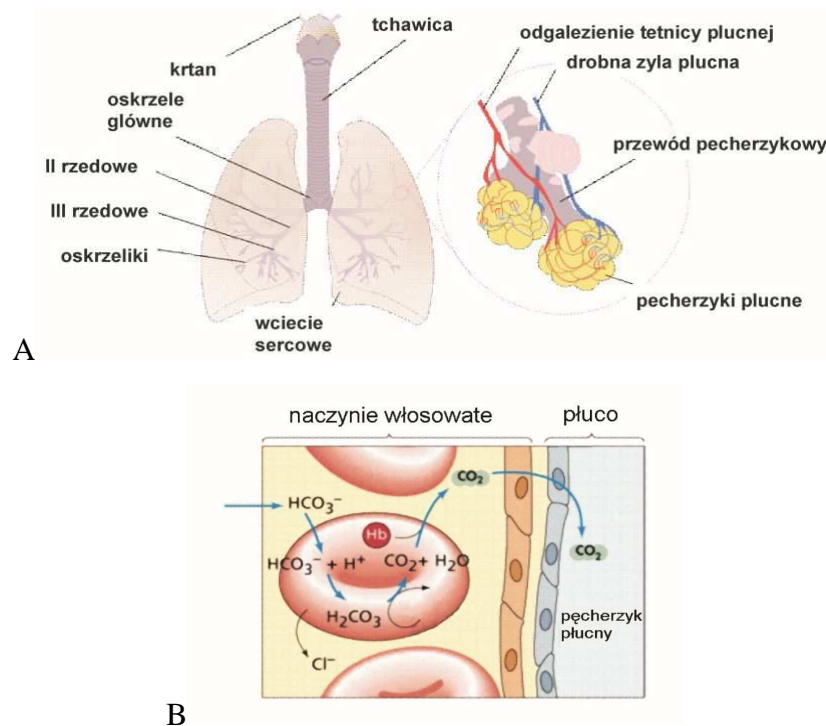
Współczesne chromatograficzne metody analizy oddechu mają swój początek w roku 1971, kiedy to Linus Pauling przy użyciu chromatografii gazowej, wykazał obecność ponad 200 związków w wydychanym przez człowieka powietrzu [2,3]. Główny problem tkwił jednak w separacji i identyfikacji tych związków. Prawdziwym przełomem w rozwoju metod analizy oddechu było wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do analizy lotnych związków organicznych przez Bengt T. Larson, S. Chen oraz M. Phillips.

3. CHARAKTERYSTYKA WYDYCHANEGO POWIETRZA

3.1. Charakterystyka i skład wydychanego powietrza

Układ oddechowy człowieka zbudowany jest z płuc i dróg oddechowych, którymi powietrze wędruje do pęcherzyków płucnych i z powrotem. Drogi oddechowe obejmują nozdrza, jamę nosową, gardziel, krtań i tchawicę, która rozgałęzia się na dwa oskrzela – lewe i prawe, prowadzące do płuc. W płucach oskrzela dzielą się na liczne odgałęzienia – oskrzeliki, te zaś rozgałęziają się wielokrotnie, przechodząc w oskrzeliki oddechowe. Oskrzeliki oddechowe rozdzielają się na kilka przewodów oddechowych, które kończą się ślepo w woreczkach oddechowych.

Pęcherzyki płucne otacza gęsta sieć włosowatych naczyń krwionośnych (rysunek 1A). Przez ścianki pęcherzyków zachodzi wymiana tlenu i dwutlenku węgla pomiędzy krwią i powietrzem w pęcherzykach płucnych. Wymiana gazowa zachodzi na drodze dyfuzji (rys. 1B). Stężenie tlenu jest większe w pęcherzykach płucnych niż w naczyniach włosowatych, dlatego dyfunduje z pęcherzyków do naczyń włosowatych. Stężenie dwutlenku węgla jest większe we krwi niż w pęcherzykach płucnych, dlatego dyfunduje z krwi w naczyniach włosowatych do pęcherzyków płucnych. W normalnych warunkach fizjologicznych powietrze pęcherzykowe zawiera dużą ilość lotnych związków organicznych, dyfundujących z krwi, poprzez płucną błonę pęcherzykową, zgodnie z gradientem prężności par [4,5].



Rys. 1. A - schemat układu oddechowego człowieka, B - wymiana gazowa w pęcherzyku płucnym [1].

W wydychanym powietrzu pojawiają się, więc, te związki, które mają dostateczną prężność par we krwi. Stężenie lotnych związków organicznych, wynika z ich produkcji w organizmie i jest określone Prawem Henry’ego [4,5]. Zdaniem autorów [6], szybkość, z jaką lotne związki organiczne pojawiają się w wydychanym powietrzu zależy od stałej Henry’ego, masy cząsteczkowej i hydrofobowości substancji.

Wydychane przez człowieka powietrze jest mieszaniną azotu (78%), tlenu (14 – 17%) oraz lotnych związków nieorganicznych tj. dwutlenku węgla, (CO₂) 3 – 4%, tlenku węgla, (CO), tlenku azotu (NO), pary wodnej (do 6%) i śladowych ilości argonu. Ponadto w wydychanym powietrzu występują lotne substancje, należące do różnych klas chemicznych: węglowodory nasycone (metan, etan, pentan), węglowodory nienasycone (izopren), węglowodory aromatyczne (benzen), aldehydy (etanal, metanal, acetaldehyd), ketony (aceton), alkohole (metanol, etanol, 2-propanol), estry (octan metylu, octan etylu), związki siarkowe (metanotiol, etanotiol, disiarczek węgla, siarczek karbonylu, siarkowodór, dimetylosiarczek), związki zawierające azot (dimetyloamina (DMA), trimetyloamina (TMA), amoniak) i inne [5,7,8]. Próbką oddechu może zawierać kilkaset lotnych związków organicznych występujących na poziomie stężeń rzędu nmol/l-pmol/l (ppb_v – ppt_v) [9,10,11]. Jeśli zwiększymy tę liczbę o związki, które przynajmniej raz pojawiły się w próbce wydychanego powietrza, sięga ona nawet 3000 [5,12,13]. W tabeli 1 zestawiono orientacyjne średnie stężenia głównych substancji znajdujących się w próbce wydychanego powietrza [2,3,5].

Tabela 1. Substancje występujące w wydychanym powietrzu i zakres ich stężeń.

Orientacyjny poziom stężeń	Substancje występujące w wydychanym powietrzu
Procent [%]	tlen, woda, dwutlenek węgla, argon
Zakres [ppm]	aceton, tlenek węgla, metan, wodór
Zakres [ppb]	izopren, etanal, metanal, pentan, etan, etanol, etylen, pozostałe węglowodory, tlenki azotu, disiarczek węgla, metanol, metanotiol, etanotiol, amoniak, dimetyloamina, trimetyloamina, siarczek dimetylu,

Wydychane przez człowieka powietrze, obok związków organicznych, zawiera również szereg gazów nieorganicznych, takich jak: tlenek węgla, tlenki azotu, czy amoniak. Oprócz substancji lotnych, w wydychanym powietrzu występują też nielotne związki organiczne (*ang.*

non volatile organic compounds; n-VOCs), takie jak: leukotrieny, cytokiny, prostoglandyny, izoprostany oraz nadtlenek wodoru [5,14]. Substancje te występują w formie aerozolu, który po wymrożeniu tworzy kondensat oddechowy (*ang. Exhaled Breath Condensates, EBC*) [15,16].

Oprócz związków endogennych, których źródłem jest metabolizm komórkowy, w oddechu znajdują się również substancje egzogenne, dostarczane z pokarmem, lekami, drogą termalną, czy powietrzem atmosferycznym. Wiele substancji znajdujących się w oddechu, jest skutkiem emisji lotnych związków organicznych z mebli, podłóg, wykładzin, tworzyw sztucznych, czy stosowanych detergentów [1,3,5]. Rozróżnienie substancji produkowanych w organizmie od tych pochodzących ze środowiska zewnętrznego, nastrocza naukowcom wiele problemów i jest przedmiotem dyskusji wielu autorów [1,5].

3.2. Skład powietrza atmosferycznego i powietrza wydychanego

W tabeli 2 porównano wybrane składniki powietrza atmosferycznego oraz powietrza wydychanego przez człowieka z rozróżnieniem na osoby zdrowe i osoby chore.

Tabela 2. Porównanie składu powietrza atmosferycznego i powietrza wydychanego [17,18].

Związek	Skład powietrza atmosferycznego (2011)	Skład wydychanego powietrza	
		osoby zdrowe	osoby chore
N ₂	78,084 ± 0,001 %	78,084 ± 0,001 %	78,084 ± 0,001 %
O ₂	20,946 ± 0,002 %	17 %	17%
H ₂ O	40ppm – 4%	do 6%	do 6%
Ar	9340 ± 10 ppm	9340 ± 10 ppm	9340 ± 10 ppm
CO ₂	390 ppm	4,5 – 5,0 %	4,5 – 5,0 %
Ne	18,18 ± 0,04 ppm	18,18 ± 0,04 ppm	
He	5,24 ± 0,04 ppm	5,24 ± 0,04 ppm	
CH ₄	1,9 ppm	2 – 10 ppm	
Kr	1,14 ± 0,01 ppm	1,14 ± 0,01 ppm	
H ₂	0,55 ppm	1 – 100 ppm	powyżej 100 ppm
N ₂ O	0,33 ppm		
CO	0,12 ppm	1 – 10 ppm	10-20 ppm
Xe	0,087 ± 0,001ppm	0,087 ± 0,001ppm	
NH ₃	0,006 – 0,02 ppm	0,25-2,9 ppm	powyżej 2,9 ppm
NO	2 ppb	10 – 50 ppb	powyżej 50 ppb
COS	0,5 ppb	0,5 -1	*
H ₂ S	< 0,2 ppb	< 75 ppb	100 ppb
SF ₆	8 ppt		
DMS	<< 1 ppt	7 ppb	10 – 40 ppb
(CH ₃) ₂ S ₂	<<1 ppt	5,6 - 8,2 ppb	10 – 40 ppb
CS ₂	0,1 ppt	< 0,1ppt	*
CH ₃ SH	-	< 0,5 ppb	0 - 10 ppb
C ₂ H ₅ SH	-	2,1 ppb	4,2 ppb
(CH ₃) ₃ N	-	-	100 – 150 ppb

4. POTENCJALNE MARKERY ODDECHOWE

Obserwacja procesów metabolicznych zachodzących w organizmie, odbywa się na podstawie związków endogennych, których źródłem jest metabolizm komórkowy, zarówno prawidłowy fizjologicznie, jak i ten zmieniony chorobowo. Potencjalnymi endogennymi markerami, które mogą mieć zastosowanie w diagnostyce medycznej i są wykrywane w wydychanym powietrzu są: nasycone i nienasycone węglowodory - etan, pentan, izopren, związki zawierające tlen – aceton, acetaldehyd, metanol, etanol, 2-propanol, związki zawierające siarkę – dimetylosiarczek, metanotiol, etanotiol, disiarczek węgla oraz związki zawierające azot – dimetyloamina, trimetyloamina, amoniak [2,5].

Związek predestynujący do miana biomarkera danej jednostki chorobowej, musi charakteryzować się następującymi cechami:

- wartość kliniczna – ścisła korelacja z daną jednostką chorobową,
- określony prostą, szybką, tanią i nieinwazyjną metodą pomiarową
- różny od tła środowiska
- związany z wydychanym powietrzem, a nie z powietrzem z martwej objętości
- ten sam wynik określony, co najmniej dwoma niezależnymi metodami
- znany wzór chemiczny i mechanizm tworzenia się w organizmie.

Trudność w wytypowaniu markera danej jednostki chorobowej polega na znalezieniu korelacji pomiędzy wydychanym związkiem, a konkretnym szlakiem metabolicznym lub jego zaburzeniem. Biosynteza lotnych związków organicznych w organizmie człowieka jest złożonym, wieloetapowym procesem, w pełni poznanym tylko dla nielicznej grupy związków.

W tabeli 3 zaprezentowano potencjalne źródło pochodzenia wybranych związków endogennych obecnych w wydychanym powietrzu [2,3,5].

Jedynie w przypadku acetonu i izoprenu określono jednoznacznie drogi pochodzenia tych związków w oddechu oraz szlak metaboliczny, w którym powstają.

W przypadku pozostałych składników oddechu wskazuje się prawdopodobny związek z danym metabolizmem [2,3,5].

Tabela 3. Źródła endogennych substancji w wydychanym powietrzu.

Związek chemiczny	Źródło pochodzenia w organizmie
acetaldehyd	Metabolizm etanolu
aceton	Dekarboksylacja acetoocjanu i acetylo-CoA
amoniak	Metabolizm białek
etan	Utlenianie lipidów
izopren	Biosynteza cholesterolu
metan	Bakterie jelitowe
metanotiol	Metabolizm metioniny
dimetyloamina	Metabolizm białek
trimetyloamina	Metabolizm białek
pentan	Utlenianie lipidów
wodór	Bakterie jelitowe

5. TECHNICZNE I METODYCZNE ASPEKTY ANALIZY ODDECHU

Mimo wielu obiecujących wyników badań, znajomości przebiegu procesów biochemicznych zachodzących w organizmie i wskazania potencjalnych biomarkerów chorób, analiza lotnych związków organicznych w wydychanym powietrzu ciągle nie jest jeszcze rutynową częścią praktyki klinicznej [2,3,5]. Dotychczas tylko kilka testów oddechowych znalazło zastosowanie w diagnostyce medycznej, wśród nich najpopularniejszymi są: test na obecność *Helicobacter pylori*, test nietolerancji laktozy, czy wykrywanie poziomu tlenku azotu (NO) u pacjentów cierpiących na astmę oskrzelową lub inne stany zapalne górnych dróg oddechowych [5]. Z wyjątkiem testów służących do diagnostyki bakterii *H.pylori*, zastosowanie tych metod w diagnostyce medycznej ma znikome znaczenie. Ograniczone wykorzystanie analizy lotnych związków organicznych obecnych w wydychanym powietrzu spowodowane jest szeregiem czynników. Główną przeszkodą są problemy techniczne związane z właściwym pobraniem próbki wydychanego powietrza oraz etapem wzbogacania analitów. Istotnym zagadnieniem jest obecność substancji egzogennej (pochodzących z zewnątrz), ponieważ stanowią częstą przyczynę błędnej interpretacji wyników. Sytuację dodatkowo komplikuje złożoność procesów metabolicznych, w których powstają wykrywane związki [5].

5.1. Pobieranie próbek wydychanego powietrza

Właściwe pobranie próbki jest najważniejszym i często najtrudniejszym etapem analizy gazów oddechowych, decyduje o poprawnym wyniku całej analizy.

Niski poziom stężeń (ppb, ppt), lotnych związków organicznych występujących w wydychanym powietrzu, wymaga od analityka zachowania szczególnej ostrożności.

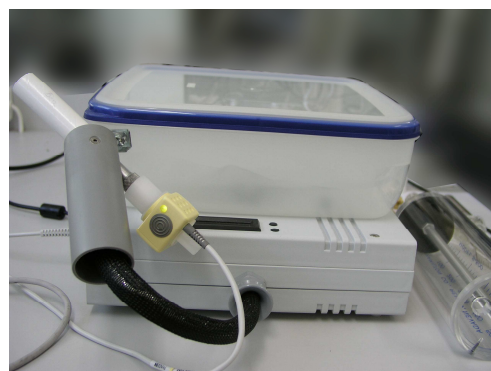
Nawet prawidłowo pobrana próbka, może już przed analizą zmienić swój skład chemiczny podczas transportu, przechowywania, czy wstępnej obróbki, a nawet podczas dozowania. Czas, jaki upływa od momentu pobrania próbki powietrza do czasu wykonania analizy powinien być możliwie najkrótszy [5,19]. Samo zaś „urządzenie” do pobierania próbki wydychanego powietrza nie powinno stawiać żadnych oporów podczas oddychania, co ma szczególne znaczenie w przypadku osób starszych, poważnie chorych i osłabionych. Ponadto, pacjenci z chorobami zakaźnymi będą skażać zarówno urządzenie, jak i próbkę, co stanowi poważne zagrożenie, zarówno dla pacjentów, jak i osób wykonujących analizy [1].

Innym ważnym aspektem, który należy mieć na uwadze podczas analizy składu wydychanego powietrza jest fakt, że wydychane przez człowieka powietrze nie jest gazem jednorodnym [2,3,5]. Z 500 ml powietrza pobranego w czasie przeciętnego wdechu (tzw. objętość oddechowa TV) tylko 350 ml dostaje się do pęcherzyków płucnych, gdzie podlega wymianie gazowej. Pozostałe 150 ml zalega w drogach oddechowych, wypełniając tzw. przestrzeń martwą. Powietrze wypełniające przestrzeń martwą, nie podlega wymianie gazowej i dlatego ta część nie powinna być analizowana [2,3,5].

Wyniki badań wskazują, że stężenia endogennych lotnych substancji w powietrzu pęcherzykowym jest ok. 2-3 – krotnie wyższe niż to, które pochodzi z powietrza oddechowego, dodatkowo powietrze pęcherzykowe ma niższe stężenie zanieczyszczeń [2,3,5].



Rys 3. Kapnograf (Novametric).



Rys 4. Breath Sampler [5].

Opracowanie metod pobierania i przechowywania próbek oddechu był jednym z kluczowych zadań europejskiego projektu BAMOD ("Breath-gas analysis for molecular-oriented detection of minimal diseases") w latach 2005-2009, którego Zakład Fizykochemii Ekosystemów był uczestnikiem. W Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN, do

pobierania próbek powietrza pęcherzykowego stosowane są dwa urządzenia: *kapnograf* (rysunek 3) oraz *breath sampler* (rysunek 4) [5]. Kapnograf jest urządzeniem dostępnym komercyjnie, „breath sampler” został skonstruowany w Innsbrucku w Breath Research Institute Austrian Academy of Sciences.

Podstawą działania obu tych urządzeń jest monitorowanie zmian zawartości dwutlenku węgla w wydychanym powietrzu, dzięki temu możliwe jest pobieranie partii powietrza pęcherzykowego z maksymalną zawartością dwutlenku węgla tj. powyżej (3,8%). Na etapie pobierania próbek wydychanego powietrza ważną rolę odgrywa rodzaj pojemnika i materiał, z jakiego jest wykonany [2,3,5]. Ważne jest, aby tworzywo, z którego jest wykonany „pojemnik” było odporne na permeację i adhezję analizowanych związków.

Fakt ten jest szczególnie istotny w przypadku substancji łatwo adsorbujących się na powierzchniach aparatury. Do takiej grupy związków, trudnej pod względem analitycznym, należą związki siarkowe oraz aminy alifatyczne. Opracowanie chromatograficznych metod analizy związków siarkowych i amin alifatycznych w próbkach gazowych i w oddechu były przedmiotem badań realizowanych w projekcie BAMOD, jak również w ramach dwóch grantów krajowych. Badania te zakończyły się opracowaniem odpowiednich metod z zastosowaniem układu GC/MS oraz GC/FPD (dla związków siarkowych). W Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów opracowano właściwe metody analizy tych związków z zastosowaniem chromatografii gazowej [20-24].

Związki siarkowe z uwagi na silne właściwości absorpcyjne, adsorpcyjne i fotoutleniające są związkami trudnymi do analizy i nastroczają wiele problemów analitycznych [20-22]. Opracowując chromatograficzną metodę analizy dla związków siarkowych, w naszym laboratorium, szczególną uwagę zwrócono na rodzaj stosowanych pojemników (worków, fiolek). Badano takie parametry, jak: przydatność do wielokrotnego użycia, poziom tła, stabilność stężeń badanych związków w różnych typach worków oraz efekt matrycy [21]. Porównano również dwie metody zateżania próbek (SPME i TD) oraz granicę wykrywalności (LOD - *ang. limit of detection*) dla zastosowanych detektorów MS i FID [21,22,24].

W przypadku analizy amin, szczególnym problemem jest ich polarność i silne właściwości adsorpcyjne. Jednak zastosowanie odpowiednich procedur obierania, przechowywania próbek pozwala na wykrywanie tych związków nawet na poziomie ppb [23].

Przeprowadzane w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów badania prowadzone były z zastosowaniem worków typu *Flex Foil*, *Tedlar* firmy SKC (rysunek 5).



Rys. 5. Worki do przechowywania próbek oddechu (SKC): (A) FlexFoil – PET/NY/AL/CPE (B) Tedlar - PVF polifluorek winylu, (C) Tedlar - PVF polifluorek winylu.

Kolejnym ważnym zagadnieniem, które należy wziąć pod uwagę jest obecność pary wodnej w wydychanym powietrzu (do 6%) i wiążąca się z tym faktem, konieczność osuszania próbki [1,2,3,5].

5.2. Metody wzbogacania próbek gazów oddechowych

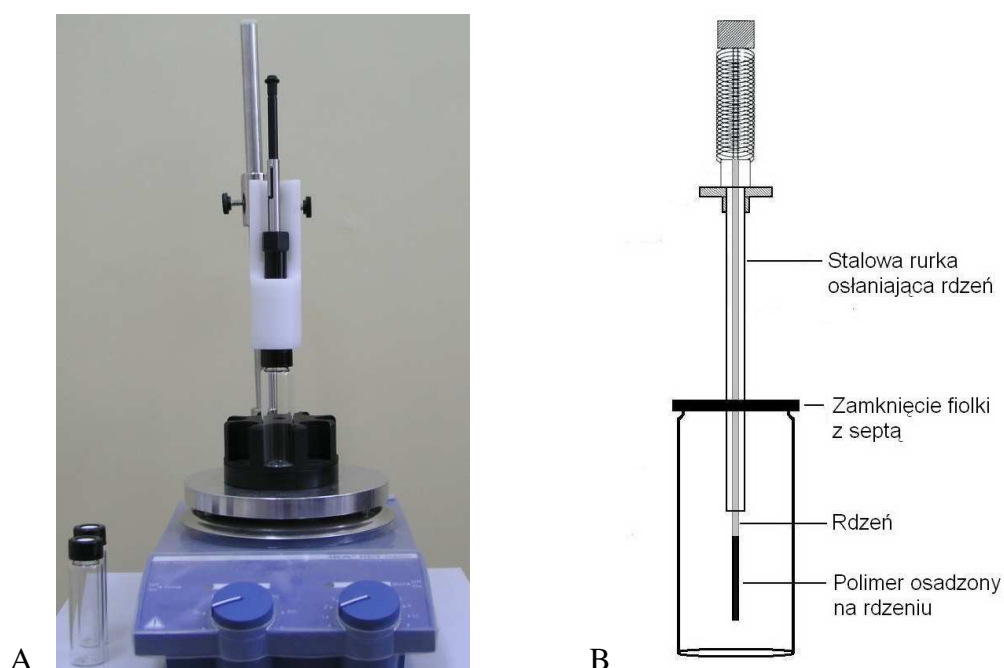
W przypadku analizy wydychanego powietrza stężenia substancji w wydychanym powietrzu mierzone są w zakresie ppb – ppt. [2,3,5]. Dla większości metod instrumentalnych taki zakres stężeń jest zbyt niski do wykrycia, dlatego konieczne jest wzbogacanie próbki na odpowiednich „pułapkach”. Zadaniem „pułapki” jest zatrzymanie tylko tych związków, które są przedmiotem analizy, a przepuszczać wszystkie inne składniki wydychanego powietrza – wliczając w to tlen i azot (stanowiące razem blisko 90% wydychanego powietrza).

Współcześnie, szczególną uwagę zwraca się na metody, które w zakresie pobierania, wzbogacania oraz uwalniania analitów nie wymagają stosowania rozpuszczalników. Stosowane w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów metody w pełni odzwierciedlają „ekologiczny” trend badawczy. Technikami mającymi zastosowanie w analizach składu wydychanego powietrza w naszym Zakładzie są techniki: mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (*ang. solid phase microextraction - SPME*) i ekstrakcji do fazy stacjonarnej (*ang. SPE – solid phase extraction*) – w naszym przypadku termiczna desorpcja (*ang. thermal desorption - TD*).

5.2.1. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej

Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej łączy w jednym etapie izolację i wzbogacanie analitów [5,19,23,25], nie wymaga zatem zastosowania dodatkowych urządzeń do desorpcji termicznej, ani też modyfikacji chromatografu.

Technika SPME polega na ekstrakcji związków organicznych z fazy gazowej lub ciekłej do warstwy adsorpcyjnej lub absorpcyjnej, osadzonej na włóknie ekstrakcyjnym. Włókno pokryte fazą stacjonarną jest osadzone w rurce ze stali nierdzewnej o małej średnicy. Rurka z kolei jest umieszczona w specjalnym uchwycie przypominającym strzykawkę. Naciśnięcie tłoka powoduje wysunięcie włókna z igły. Dzięki wycięciu w obudowie uchwytu tłok może być zablokowany w tej pozycji. Po odblokowaniu tłok powraca do położenia wyjściowego, dzięki czemu włókno chowa się ponownie w igłę [19,25]. Do zalet techniki SPME zaliczyć można: krótki czas ekstrakcji, wspomniany wcześniej brak konieczności stosowania rozpuszczalników, stosunkowo niski koszt oraz prostotę analizy [5,25]. Rysunek 5 przedstawia stanowisko do techniki SPME oraz schemat urządzenia do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej.



Rys. 5. Widok (A) oraz schemat urządzenia do mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (SPME) (B).

Po wprowadzeniu igły do fiołki, przez naciśnięcie tłoka, włókno wysuwa się z igły. Anality zawarte w próbce dzielą się między fazę stacjonarną osadzoną na włóknie i matrycę. O ilości związku w fazie stacjonarnej decyduje współczynnik podziału. Po określonym czasie, zależnym od charakteru analitów i dobieranym doświadczalnie, włókno jest chowane w igłę. Następnym etapem jest desorpcja w dozowniku chromatografu. Po przebiciu membrany dozownika, włókno jest ponownie wysuwane z igły. Wysoka temperatura dozownika, dobrana w zależności od rodzaju stosowanego włókna, powoduje natychmiastową desorpcję zaadsorbowanych związków. Uwolnione w ten sposób cząsteczki analitów są porywane przez

gaz nośny i przenoszone do kolumny chromatograficznej, gdzie następuje ich rozdzielanie. Na podstawie czasów retencji zgodnych z czasami wyznaczonymi dla wzorców oraz po wykonaniu kalibracji możliwe jest oznaczenie jakościowe i ilościowe próbki.

Wybór odpowiedniego włókna, w dużej mierze zależy od właściwości chemicznych analitu. Ekstrakcja powinna być przeprowadzona w myśl zasady „podobne rozpuszcza się w podobnym”, tzn. związki o charakterze polarnym dobrze ekstrahowane będą na włóknach pokrytych sorbentem o polarnym charakterze grup funkcyjnych [5,8]. Rodzaj fazy stacjonarnej pokrywającej włókno SPME determinuje zarówno czułość, jak i selektywność danej metody [25].

W tabeli 4 przedstawiono handlowo dostępne włókna SPME produkowane przez firmę *Supelco*, wraz z opisem i zastosowaniem [26].

Tabela 4. Standardowe włókna do SPME (*Supelco*).

Faza stacjonarna	Skrót	Grubość filmu [μm]	Max temp [°C]	Zalecana temp [°C]	Temp kondycjonowania [°C]	Czas kondycjonowania [h]
Włókna niepolarne						
Polidimetylosiloksan	PDMS	100	280	200 - 280	250	0,5
		30	280	200 - 280	250	0,5
		7	340	220 - 320	320	1
Włókna polarne						
Poliakrylan	PA	85	320	220 - 310	300	2
Włókna mieszane						
Polidimetylosiloksan/ Divinylobenzen	PDMS/ DVB	65	270	200 - 270	250	0,5
Carboxen/ Polidimetylosiloksan	CAR/ PDMS	85 i 75	320	250 - 310	300	1 - 2
Carbowax/ Divinylobenzen	CW/ DVB	65 i 75	260	200 - 250	220	0,5
Divinylobenzen/ Carboxen/ Polidimetylosiloksan	DVB/ CAR/ PDMS	30/50	270	230 - 270	270	1

Wszystkie dostępne rodzaje włókien zostały przetestowane w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN Kraków, pod kątem przydatności do badań składu wydychanego powietrza [21-23]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, najlepsze wyniki zateżenia lotnych związków organicznych zawartych w wydychanym powietrzu, otrzymano przez zastosowanie włókna - pokrytego warstwą carboxenu i polidimetylosiloksanu (CAR/PDMS).

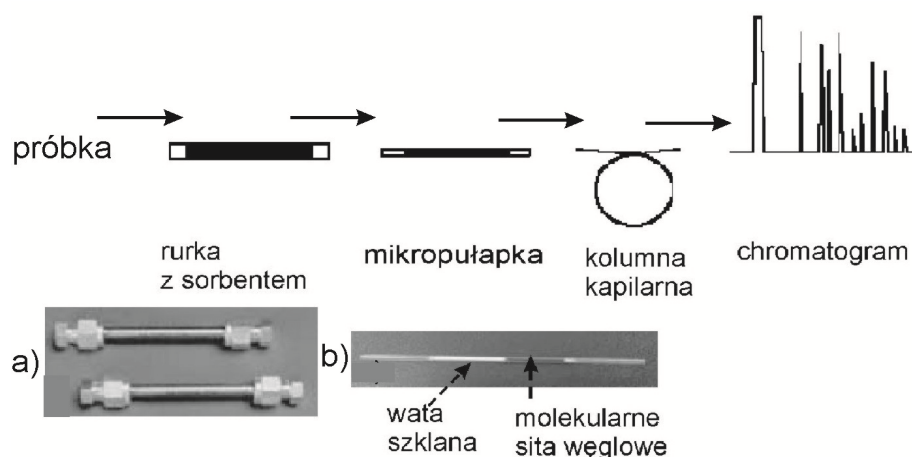
5.2.2. Termiczna desorpcja

Termiczna desorpcja (TD) to kolejna technika polegająca na adsorpcji analitów na sorbencie. W tym przypadku sorbent umieszczony jest w stalowej lub szklanej rurce w ilości kilku mg.

Adsorpcja analitów następuje na sorbencie wypełniającym rurkę podczas zasysania, odpowiedniej objętości próbki (za pomocą pompki – metoda dynamiczna) lub przez ekspozycje rurki w badanym środowisku (metoda statyczna).

Zastosowanie termicznej desorpcji umożliwia zatężenie analitów ze znacznie większej ilości próbki (kilkaset ml, kilka litrów) niż w przypadku techniki SPME. Po zaadsorbowaniu próbki rurka umieszczana jest w piecu termicznego desorbera, gdzie pod wpływem odpowiednio dobranej temperatury desorpcji anality zostają uwolnione i przekazane do adsorpcji na mikropułapce (*ang. cold trap*) zawierającej węglowe sita molekularne. Mikropułapka chłodzona jest za pomocą ogniwa Peltiera, które umożliwia szybkie chłodzenie i ogrzewanie kwarcowej rurki w zakresie temperatur od -10 do 325°C. Zadaniem mikropułapki jest ponowne zaadsorbowanie próbki i zmniejszenie jej objętości, co pozwala uniknąć „efektu rozmycia”.

Zastosowanie ogniwa Peltiera pozwala uzyskać właściwe warunki adsorpcji i szybkiej desorpcji, czego wynikiem jest punktowe dozowanie próbki z linii transferowej na kolumnę kapilarną. Ogólny schemat procesu termicznej desorpcji z uwzględnieniem mikropułapki, został przedstawiony na rysunku 6.



Rys. 6. Schemat procesu termicznej desorpcji: a) rurki sorpcyjnej (*Markes*), b) cold trap

Rurki sorpcyjne do termicznej desorpcji, przechowuje się zamknięte na obydwu końcach. W rurkach adsorpcyjnych umieszcza się węgle aktywne, sadze grafityzowane, polimery porowate, podziałowe wypełnienia chromatograficzne (faza ciekła na nośniku), żel krzemionkowy oraz zeolitowe i węglowe sita cząsteczkowe [5,19,27].

W praktyce bardzo często stosuje się rurki, które zawierają kilka różnych sorbentów. Zastosowanie sorbenta o odpowiednich, względem oznaczanych związków właściwościach (polarność, rozmiar ziaren, wielkość powierzchni sorpcyjnej), umożliwia selektywne wzbogacenie analitów. Idealnie dobrany sorbent powinien selektywnie adsorbować oznaczane substancje, łatwo desorbować je podczas procesu desorpcji, nie powinien chłonać wody i być stabilny termicznie [5,28,29].

Przeprowadzone badania wykazały, że sorbenty wykonane z polimerów organicznych są najbardziej odporne na adsorpcję pary wodnej obecnej w wydychanym przez człowieka powietrzu, ale z drugiej strony małe cząsteczki węglowodorów są przez ten sorbent słabo „wychwytywane”. Z kolei węglowe sita molekularne oraz węgle grafityzowane, które mają dużą pojemność sorpcyjną, powodują powstanie tzw. efektu pamięci.

Z uwagi na fakt, że idealny sorbent nie istnieje, aby zminimalizować wady powszechnie dostępnych sorbentów, stosuje się złoża wielowarstwowe [5,28]. Adsorbenty mogą być stosowane wielokrotnie, poprzez aktywację w wysokiej temperaturze i w przepływie gazu np. helu [5,28,29].

W tabeli 5 przedstawiono sorbenty stosowane do zatężania i wzbogacania analitów obecnych w wydychanym przez człowieka powietrzu [5].

Tabela 5. Wykaz najczęściej stosowanych sorbentów do analizy wydychanego powietrza.

Rodzaj adsorbenta	Zastosowanie	Rozmiar ziaren [μm]	T_{max} [$^{\circ}\text{C}$]	Powierzchnia właściwa sorbenta [m^2/g]	Gęstość [g/ml]
Węglowe sita molekularne					
Carboxen 563	C2 - C5	20/45	400	510	0,53
Carboxen 564	C2 - C5	20/45	400	400	0,60
Carboxen 569	C2 - C5	20/45	400	485	0,58
Carboxen 1000	C2 - C5	60/80	400	1200	0,44
Carboxen 1001	C2 - C5	60/80	400	500	0,61
Carboxen 1003	C2 - C5	40/60	400	1000	0,46
Carbosieve SIII	C2 - C5	60/80	400	820	0,61
Carbospher	C2 - C5	60/80	400	1000	-
Węgle grafityzowane					
Carbotrap F	C20	20/40	400	5	0,66
Carbotrap C	C12 - C20	20/40	400	10	0,72
Carbotrap Y	C12- C20	20/40	400	25	0,42
Carbotrap X	C3 - C5	20/40	400	250	0,41
Carbograph 5	C3 - C5	20/40	400	560	
Organiczne polimery porowate					
Chromosorb 106 (styren/diwinylobenzen)	Niewielkie cząsteczki	60/80	250	750	-
Tenax TA	Niewielkie cząsteczki	60/80	350	35	0,25
Poli-(2,6-difenylo)-p-tlenek fenylu	cząsteczki				

Zaletą termicznego uwalniania analitów jest znaczące obniżenie granicy oznaczalności w porównaniu do desorpcji rozpuszczalnikiem. Związki desorbowane termicznie są w całości podawane na kolumnę chromatograficzną, podczas, gdy w desorpcji rozpuszczalnikiem dozuje się zwykle ułamek procenta ekstraktu, jednocześnie brak rozpuszczalnika w dozowanej próbce umożliwia analizę związków w tym samym lub zbliżonym do rozpuszczalnika czasie retencji. Charakter procesu termicznej desorpcji umożliwia łatwe połączenie desorbera z chromatografem gazowym. Dodatkowymi zaletami termicznej desorpcji jest: krótszy czas analizy, możliwość ponownego użycia sorbentu do zatężenia po desorpcji, możliwość analizy *on line* np. na chromatografie gazowym (GC), czy układzie GC/MS [16,30].

6. METODY ANALIZY GAZÓW ODDECHOWYCH

Duża różnorodność właściwości fizykochemicznych związków wchodzących w skład wydychanego powietrza, sprawia, że nie jest możliwe zidentyfikowanie i ilościowe oznaczenie poszczególnych składników poprzez użycie jednej, prostej metody analitycznej.

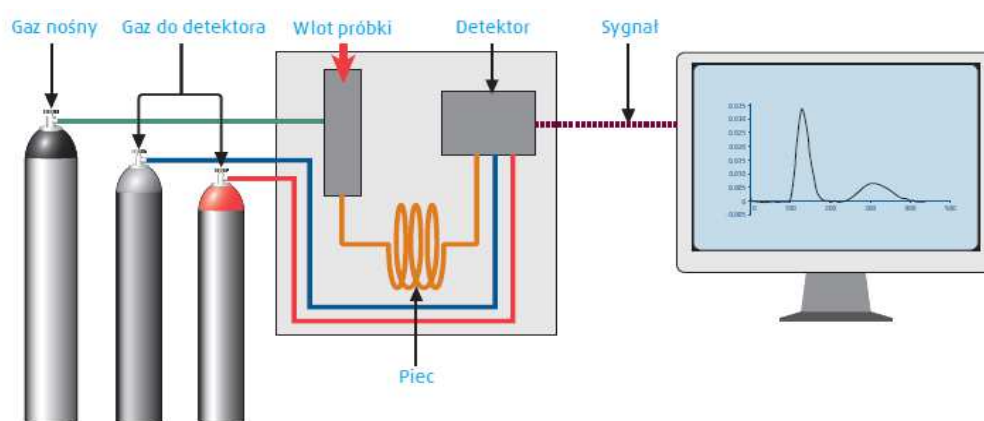
Wiele lat badań poświęconych analizie składu wydychanego powietrza, zaowocowało opracowaniem różnorodnych metod analizy oddechu. Wśród wielu dostępnych metod analitycznych, najpopularniejsze z nich oparte są na technikach chromatograficznych.

Do nowoczesnych metod analizy oddechu należy zaliczyć: chromatografię gazową (GC), chromatografię gazową ze spektrometrią masową (GC/MS), spektroskopię laserową, spektrometrię mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR/MS) (ang. *proton-transfer reaction mass spectrometry*), spektrometrię mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT-MS) (ang. *selected ion flow tube mass spectrometry*), oraz spektrometrię ruchliwości jonów (IMS) (ang. *ion mobility spectrometry*) [2,3,5].

6.1. Chromatografia gazowa z różnym systemem detekcji

Chromatografia gazowa należy dziś do jednej z najbardziej rozpowszechnionych metod instrumentalnych w chemii analitycznej, a w analizie związków organicznych osiągnęła pierwsze miejsce. Tak wysoką pozycję wśród innych metod analitycznych zapewnia jej możliwość wykrywania, identyfikowania i oznaczania substancji analizowanej w próbce na bardzo niskim poziomie stężeń wobec wielu innych substancji [27,30-32]. Chromatografia gazowa należy do jednej z głównych metod stosowanych do wykrywania i identyfikacji związków zawartych w wydychanym powietrzu [2,3,5]. W połączeniu z detektorem, kolumna chromatograficzna, stanowi układ do rozdziału i ilościowego określania składników tak

złożonych mieszanin, jaką jest np. wydychane powietrze. Różnorodność klas związków chemicznych obecnych w wydychanym powietrzu, wymaga zastosowania odpowiednich kolumn chromatograficznych, pozwalających na skuteczne rozdzielenie lotnych związków organicznych. Dobór właściwej kolumny jest ważnym etapem każdej analizy chromatograficznej. W ciągu ostatnich lat, coraz popularniejsze stają się kolumny kapilarne o średnicy od 0,2 do 0,6 mm i długości do 60 m. Zaletami kolumn kapilarnych jest lepsza rozdzielczość analizowanych związków, krótszy czas analizy oraz mniejsze zużycie gazów nośnych. Ogólny schemat chromatografu gazowego przedstawiono na rysunku 7.



Rys.7. Schemat głównych elementów chromatografu gazowego.

Istota działania detektorów stosowanych w chromatografii gazowej polega na tym, że reagują one na różnice właściwości fizykochemicznych gazu nośnego i tego gazu, w którym znajdują się substancje eluowane z kolumny. Detektor chromatograficzny powinien charakteryzować się dużą czułością, powinien mieć dużą stabilność linii podstawowej, a zakres liniowości jego wskazań powinien być jak najszerszy [19,27,32,33]. Dlatego detektor jest tym lepszy, im szerszy jest zakres jego liniowości. W przypadku analiz wykonywanych w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów, rozdział związków siarki od matrycy węglowodorowej jest często trudny, zwykle konieczna jest selektywna detekcja siarki, wówczas najlepszym rozwiązaniem są detektory selektywne na siarkę [20,27,32,33,34]. Selektywność eliminuje interferencję innych składników matrycy. Do analizy składu wydychanego powietrza, stosuje się następujące rodzaje detektorów: detektor płomieniowo – jonizacyjny (ang. *FID* – *Flame Ionization Detector*), detektor płomieniowo – fotometryczny (ang. *FPD* – *Flame Photometric Detector*), detektor wychwytu elektronów (ang. *ECD* – *Electron Capture Detector*) oraz spektrometr masowy [2,3,5].

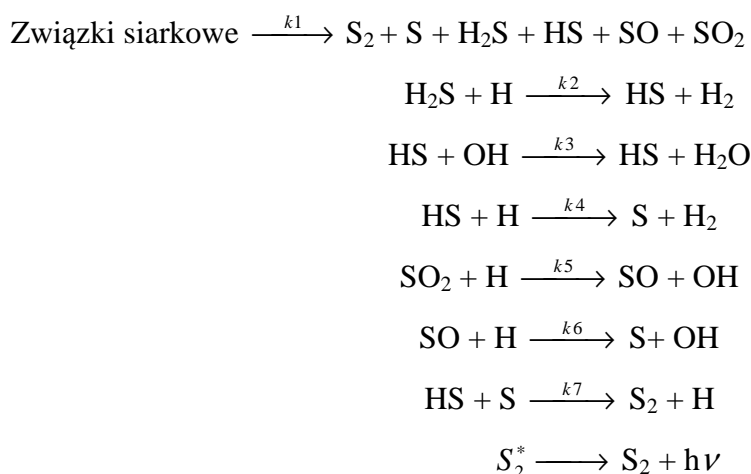
6.1.1. Detektor płomieniowo – jonizacyjny

Detektor płomieniowo - jonizacyjny (FID) z uwagi na niski poziom detekcji i szeroki zakres dynamiczny, jest obecnie najbardziej rozpowszechnionym detektorem w chromatografii gazowej. Detektor reaguje na związki organiczne zawierające w swej strukturze atomy wodoru, natomiast nie reaguje na związki nieorganiczne takie, jak: CO, CO₂, COS. Graniczna wykrywalność węglowodorów jest rzędu 10⁻¹¹ g węglu/s [19,27,32,33].

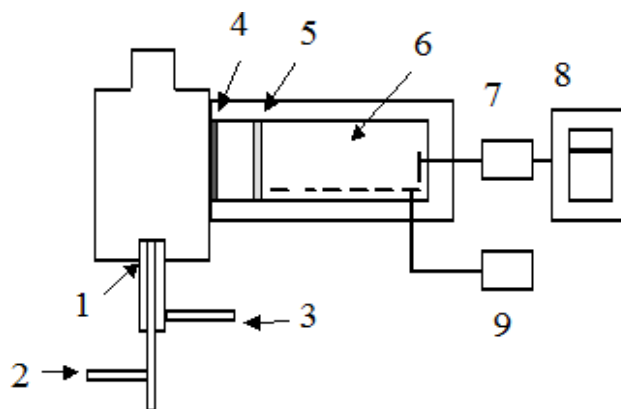
Autorzy pracy [35] zalecają użycie detektora FID do analizy lotnych węglowodorów zawartych w wydychanym powietrzu. Badania wykonywane w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów PAN Kraków, potwierdziły przydatność chromatografu gazowego z detektorem FID do badania zawartości pentanu w wydychanym powietrzu [36].

6.1.2. Detektor płomieniowo – fotometryczny

Detektor płomieniowo – fotometryczny (FPD), jest przeznaczony do selektywnego wykrywania śladowych ilości związków siarki i fosforu na poziomie pg [19,20,30,31,33]. Działanie detektora opiera się na wykorzystaniu zjawiska chemoluminescencji zachodzącego w zewnętrznym płaszczu płomienia nad końcem palnika. Wzbudzone cząsteczki siarki S₂^{*} przechodząc do stanu podstawowego, emitują promieniowanie z paśmie od 320 do 460 nm, z maksimum przy długości fali 396 nm. Reakcje chemiczne zachodzące w płomieniu bogatym w wodór:



Na rysunku 8 przedstawiony został ogólny schemat detektora płomieniowo – fotometrycznego (FPD)



Rys. 8. Schemat detektora płomieniowo – fotometrycznego [33].

1 – wlot powietrza, 2 – wlot dodatkowego strumienia wodoru, 3 – wlot wodoru,
4 – filtr promieniowania podczerwonego, 5 – filtr interferencyjny, 6 – fotopowielacz, 7 –
elektrometr, 8 – rejestrator, 9 – zasilacz wysokiego napięcia

Poziom wykrywalności detektora FPD wnosi od 2 do 50 [pg(S)/s], a czułość silnie zależy od wydatku wodoru i powietrza. Zakres dynamiczny wynosi od 2 do 2,5 rzędów wielkości. Analiza związków siarki wymaga specjalnego wyposażenia chromatografu gazowego, z uwagi na charakterystyczne adsorpcyjne właściwości związków siarki, całą linię pneumatyczną wykonuje się z teflonu [33]. Granica wykrywalności (*ang. LOD - Limit of detection*) – najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenia substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury, czy też techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

Dla detektora FPD granica wykrywalności (LOD) jest definiowana, jako:

$$\text{LOD} = 2 \times N_i / S_i$$

gdzie: N_i – szum (*noise*),

S_i – czułość (*sensitivity*).

Kiedy dany związek siarkowy jest wprowadzany do płomienia, wzbudzone cząsteczki siarki S_2^* przechodząc do stanu podstawowego, emitują promieniowanie. Sygnał detektora jest proporcjonalny do kwadratu stężenia związku siarkowego w płomieniu

$$\text{LOD} (S) = [2 \times N_S / S_S]^{1/2} . \quad (1)$$

Czułość wyrażona jest równaniem:

$$S_S = (A_s / m_s) (1 / \dot{m}_s) , \quad (2)$$

gdzie: N_S – szumy (*noise*),

S_S – czułość (*sensitivity*),

A_s – powierzchnia pików,

m_s - masa związku siarkowego,

\dot{m}_s - szybkość przepływu masy.

Łącząc równanie (1) i (2) otrzymujemy:

$$\text{LOD (S)} = [2 \times N_s \times m_s \times \dot{m}_s / A_s]^{1/2} \quad (3)$$

Szybkość przepływu masy związku siarkowego określona jest równaniem:

$$\dot{m}_s = m_s / w_{1/2}, \quad (4)$$

gdzie $w_{1/2}$ – szerokość piku w połowie wysokości,

otrzymujemy równanie:

$$\text{LOD(S)} = \left[\frac{2 \times N_s \times m_s \times m_s}{A_s \times w_{1/2}} \right]^{1/2}. \quad (5)$$

6.1.3. Detektor wychwytu elektronów

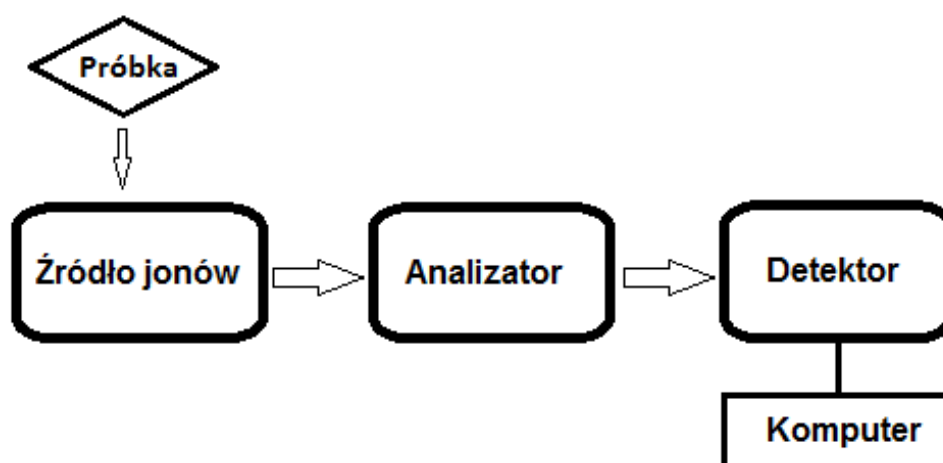
Detektor wychwytu elektronów (ECD), należy do grupy detektorów radiojonizacyjnych. Umożliwia on wykrywanie śladowych ilości związków wykazujących powinowactwo elektronowe, np. tlenu, sześćofluorku siarki, tlenków azotu, halogenowęglodorów, np. freonów, karbonyli, nitryli, azotanów, związków metaloorganicznych i węglodorów poliaromatycznych na poziomie pg. Nie jest natomiast przydatny do wykrywania węglodorów alifatycznych, estrów, eterów. Dzięki wysokiej selektywności i niskiej granicy wykrywalności obszar zastosowań metod analitycznych z zastosowaniem detektora ECD wciąż się poszerza [33]. Opis metody pomiaru śladowych stężeń związków chlorowcowych i SF₆ w powietrzu i wodzie za pomocą chromatograficznej metody analitycznej z wykorzystaniem detektora ECD można znaleźć w opracowaniu [37].

6.2. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas

Spektrometrię mas stworzyli na przełomie XIX i XX wieku dwaj brytyjscy naukowcy Joseph John Thomson i William Aston. Początkowo w spektrometrach stosowano technikę jonizacji strumieniem elektronów i analizator magnetyczny. Kolejne lata sukcesywnie przynosiły nowe rozwiązania konstrukcyjne, aż do stworzenia w 1956 roku zestawu GC/MS, czyli połączenia chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Spektrometria mas umożliwia analizę jakościową i ilościową zarówno prostych, jak i bardzo złożonych wysokocząsteczkowych biomolekuł, a dzięki połączeniu z innymi technikami chromatograficznymi, również analizę skomplikowanych mieszanin. System GC/MS zajmuje

czołową pozycję w chemii analitycznej, gdyż łączy wysoką czułość z szerokim zakresem zastosowań i wszechstronnością [5,38]. Połączenie chromatografii ze spektrometrią mas jest ważne w chemii analitycznej ze względu na uzupełniające się cechy obu technik. Chromatografy działające oddzielnie są wspaniałymi urządzeniami do rozdzielania składników mieszaniny, ale nie pozwalają na identyfikację tych składników z całkowitą pewnością, gdyż jedynym kryterium identyczności eluowanej substancji jest czas potrzebny do jej przejścia przez chromatograf, czyli czas retencji. Często zdarza się, że niektóre substancje mogą mieć te same czasy retencji. Dlatego chromatograf powinien być sprzężony z przyrządem, który może dostarczać informacji strukturalnych, a takim urządzeniem jest spektrometr masowy. Spektrometria mas jest potężną metodą identyfikacji czystych substancji, lecz widma mas mieszanin zwykle są zbyt skomplikowane, aby mogły być przydatne. Dlatego też sprzężenie chromatografii ze spektrometrią mas dostarcza bardzo skutecznego narzędzia do jakościowej charakterystyki złożonych mieszanin poprzez wykorzystanie najpierw zdolności rozdzielczej chromatografii w celu otrzymania czystych składników (w przepływającym strumieniu), a następnie zdolności spektrometrii mas do identyfikacji tych już rozdzielonych związków. Uważa się, że GC/MS jest najpopularniejszym narzędziem do identyfikacji lotnych związków organicznych zawartych w tak złożonych matrycach, jaką jest wydychane przez człowieka powietrze.

Spektrometr mas składa się z kilku zasadniczych części: układu wprowadzania próbki, źródła jonów, analizatora, detektora oraz rejestratora. Ogólny schemat budowy spektrometru masowego, przedstawiono na rysunku 9.



Rys. 9. Schemat blokowy spektrometru masowego.

Detekcja składników analizowanej próbki polega na jonizacji cząsteczek, po uprzednim ich rozdzieleniu w kolumnie chromatograficznej. W wyniku rozpadu jonów molekularnych i reakcji przegrupowań, otrzymuje się jony fragmentacyjne, które są rozdzielane w analizatorze mas, zgodnie ze stosunkiem masy do ładunku (m/z) [19,27,32,38]. W spektrometrii mas stosowane są dwa rodzaje jonizacji cząsteczek: jonizacja elektronami (*ang. electron impact - EI*) oraz jonizacja chemiczna (*ang. chemical ionization, CI*). Jonizacja elektronami polega na emisji strumienia elektronów z rozżarzonego do temperatury ok. 2000°C włókna wolframowego. Elektron jonizujący o odpowiednio dużej energii (standardowo stosuje się energię 70eV), przebiegając w pobliżu elektronu walencyjnego, powoduje jego wybite z cząsteczki, w wyniku czego cząsteczka przechodzi w postać jonową (M^+).

Ponieważ powstające jony cząsteczkowe (M^+) są w stanie wzbudzenia, szybko ulegają dalszemu rozpadowi (procesowi fragmentacji) na jony fragmentacyjne lub/i ulegają reakcjom przegrupowania. Im większa cząsteczka, tym więcej powstaje jonów fragmentacyjnych, co z kolei wiąże się z większą ilością sygnałów na widmie masowym.

Na widmie mas uzyskanych tą techniką widocznych jest wiele jonów, dzięki którym uzyskuje się informacje na temat struktury badanego związku. Silna fragmentacja jest jednocześnie wadą i zaletą tej techniki, bo jon molekularny jest często niewidoczny. Wówczas informacje na temat masy związku można uzyskać poprzez obniżenie energii strumienia elektronów albo stosując inną metodę jonizacji, np. jonizację chemiczną. W jonizacji chemicznej do komory jonizacyjnej wraz z analizowaną substancją wprowadza się dużą ilość gazu pomocniczego (reakcyjnego), najczęściej metanu. Gaz reakcyjny jest jonizowany w strumieniu elektronów, dając tzw. jony pierwotne, które w wyniku dalszych przemian tworzą jony jonizujące cząsteczki analitu. Jonizacja chemiczna zaliczana jest do metod łagodnej jonizacji, fragmentacja jest niewielka, a w jej wyniku otrzymujemy głównie jony pseudomolekularne. W tym przypadku, można szybko określić masę związku, ale niewiele można powiedzieć o strukturze wewnętrznej analitu. Jonizacja chemiczna, stanowi więc cenne uzupełnienie widm uzyskanych metodą jonizacji elektronowej.

Jony z komory jonizacyjnej wprowadzane są do analizatora mas, gdzie ulegają rozdzieleniu na podstawie stosunku ich masy do ładunku. Z wielu dostępnych na rynku analizatorów mas najpopularniejszymi są: kwadropolowy analizator mas, pułapka jonowa oraz analizator czasu przelotu (*ang. time of flight, TOF*) [5,19,38].

Kwadropolowy analizator mas, składa się najczęściej z czterech równolegle ułożonych prętów, do których przyłożone jest napięcie. Pod wpływem prądu elektrycznego, jony

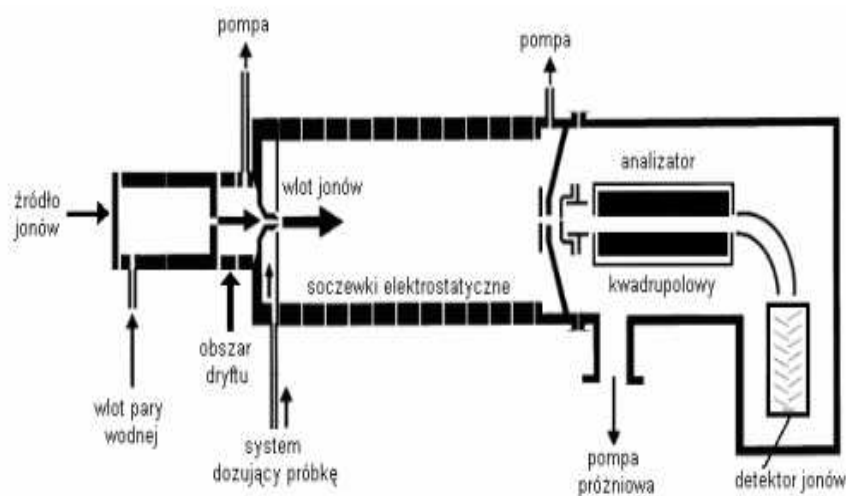
poruszające się między elektrodami, zaczynają oscylować. Oscylacja odbywa się pomiędzy prętami o przeciwnej polarności. Tylko jony o określonym stosunku masy do ładunku mają stabilny tor i docierają do detektora, pozostałe rozładowują się i osadzają na elementach analizatora [3,19,27,32,38].

Pałapka jonowa jest analizatorem zbudowanym z trzech elektrod, wytwarzających pole elektryczne. Pole to umożliwia przechowywanie jonów w komorze. W momencie, kiedy jony zostają uwięzione w komorze przez oscylujące pola elektryczne, niektóre z jonów będą miały stabilne trajektorie i pozostaną w pałapce, inne jony zaś o niestabilnych trajektoriach są wyrzucane z pałapki, odpowiednio względem ich m/z , a następnie rejestrowane. Cały cykl działania pałapki jonowej opiera się na wytworzeniu porcji jonów przez wpuszczenie impulsu elektronów, uwięzieniu wszystkich jonów, a następnie przez zmianę potencjału, wywołanie niestabilnych ruchów jonów i skierowanie ich do detektora, zgodnie z wartościami m/z . Jest to bardzo szybki sposób skanowania, wielokrotne powtarzanie takiego cyklu pracy pałapki jonowej, umożliwia zarejestrowanie widm masowych. Dzięki zastosowaniu pałapki jonowej w spektrometrze mas, zyskuje się wysoką rozdzielczość oraz bardzo dużą czułość [3,5,19,27,32,33,38].

Spektrometry z analizatorem czasu przelotu (*ang. time of flight, TOF*) obecnie wykorzystywane są w coraz szerszym zakresie do analizy lotnych związków organicznych. Rozdzielanie jonów jest oparte na pomiarze ich czasu przelotu, czyli prędkości uzyskanych po przyspieszeniu w polu elektrycznym. Jony wyrzucane są z komory jonizacyjnej do rury przelotowej, na końcu, której znajduje się detektor. Im większa jest masa pojedynczo naładowanego jonu, tym dłuższy jest czas jego przelotu. Do detektora docierają, więc jony w kolejności od najlżejszych do najcięższych, w dostępie czasu poniżej 10^{-7} s. Analizatory TOF cechują się umiarkowaną czułością, krótkim czasem odpowiedzi detektora oraz wysoką rozdzielczością.

6.2.2. Spektrometria mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (PTR/MS)

Spektrometria mas z jonizacją poprzez przeniesienie protonu (*ang. proton transfer reaction mass spectrometry, PTR/MS*) jest stosunkowo nową techniką mającą zastosowanie w bezpośredniej analizie lotnych związków organicznych na śladowym poziomie stężeń (ppb) [1,5,6,39,40]. Technika PTR/MS pozwala śledzić zmiany stężeń analitów w czasie krótszym niż 1sekunda. Spektrometr PTR/MS jest zbudowany ze źródła jonów, komory reakcyjnej, analizatora kwadrupolowego oraz detektora jonów. Ogólny schemat połączenia PTR/MS, przedstawiono na rysunku 10.



Rys. 10. Schemat połączenia PTR-MS [1,39].

Zasada działania tego typu spektrometru polega na doprowadzeniu pary wodnej do obszaru jonizacji i wytworzeniu charakterystycznych jonów reakcyjnych H_3O^+ . Jony H_3O^+ powstają w wyniku jonizacji elektronami lub pod wpływem działania promieniowania alfa emitowanego np. przez izotop ^{241}Am . Otrzymanie jonów reakcyjnych o dużej czystości, przyczynia się do znacznego zwiększenia czułości metody oraz powoduje, że zbyteczne staje się zastosowanie układu kwadrupolowego, celem wyselekcjonowania jonów reakcyjnych, przed ich przedostaniem się do obszaru reakcyjnego. Jedyne zanieczyszczenie mogą stanowić jony O_2^+ , powstające w wyniku reakcji przeniesienia ładunku, pomiędzy H_2O^+ , a O_2 . Jony reakcyjne, trafiają następnie do obszaru, gdzie za pomocą gazu wprowadzana jest badana próbka. Jony H_3O^+ bardzo szybko reagują z cząsteczkami analitów (R), na zasadzie reakcji przeniesienia protonu, w wyniku, czego powstają kationy analizowanych substancji (RH^+), przedostające się do obszaru dryftu, gdzie są rozdzielane w polu elektrycznym pod względem masy do ładunku (m/z). Jonami reakcyjnymi mogą być również jony NH_4^+ . Z uwagi na fakt, że większość lotnych związków organicznych, posiada większą zdolność przyłączania protonu z cząsteczki H_3O^+ , niż cząsteczka wody, dlatego każde zderzenie jest efektywne i prowadzi do powstania kationu.

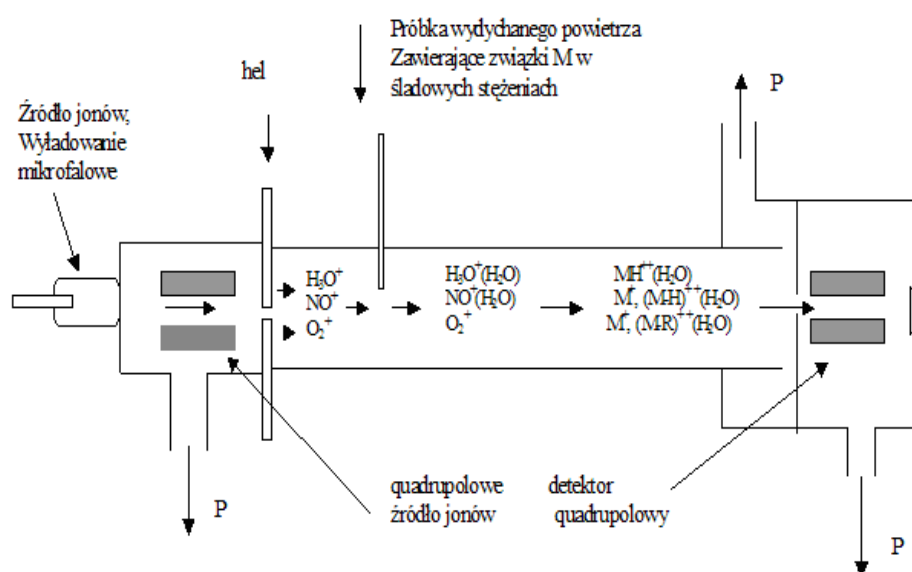
Zastosowanie jonów H_3O^+ , jako jonów reakcyjnych jest korzystne, ponieważ nie powoduje jonizacji nieorganicznych składników powietrza (tlenków azotu, tlenu, tlenku węgla, dwutlenku węgla, azotu i gazów szlachetnych) [5,6,41,42]. Wyjątkiem mogą być alkanany o małej masie cząsteczkowej, charakteryzującej się niskim powinowactwem do protonów, w takich warunkach może zajść proces dysocjacyjnego przeniesienia protonu,

prowadzący w efekcie do powstania mieszaniny produktów reakcji. Jony opuszczające obszar dryftu, trafiają do analizatora, gdzie ulegają rozdzielaniu. Wynikiem analizy metodą PTR/MS są widma poszczególnych substancji. Zaletą stosowania techniki, PTR/MS jest fakt, że obecność dużej ilości pary wodnej w wydychanym powietrzu nie zakłóca wyników pomiarów. W oznaczeniach związków polarnych, technika PTR/MS przewyższa czułością GC/MS około 20-krotnie [1,5]. Problem pojawia się w przypadku analizy złożonych mieszanin, ponieważ izomery dają jony pseudomolekularne o identycznych wartościach m/z . Dlatego technika PTR/MS wykorzystywana jest głównie do oznaczania ilościowego analitów, których obecność została już wcześniej potwierdzona innymi metodami. Technika PTR/MS nie może służyć do identyfikacji nieznanymi substancji [5,43].

Z uwagi na fakt, że układ PTR/MS cechuje się dużą czułością (rzędu ppb-ppt), można pominąć proces wzbogacania oraz wstępnego rozdzielania analitów. Technika ta znajduje zastosowanie w analizie lotnych związków organicznych, obecnych w wydychanym przez człowieka powietrzu, ponieważ takie związki, jak: H_2O , CO_2 , O_2 , N_2 , obecne w próbkach wydychanego powietrza na wysokich poziomach stężeń, nie zakłócają wyników pomiaru, gdyż nie ulegają reakcji przeniesienia protonu.

6.2.3. Spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT/MS)

Spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (*ang. Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry – SIFT/MS*), jest techniką służącą do bezpośredniego oznaczania lotnych związków w matrycach gazowych [3,5]. Schemat budowy spektrometru mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów zaprezentowano na rysunku 11 [44].



Rys. 11. Schemat układu SIFT-MS [44].

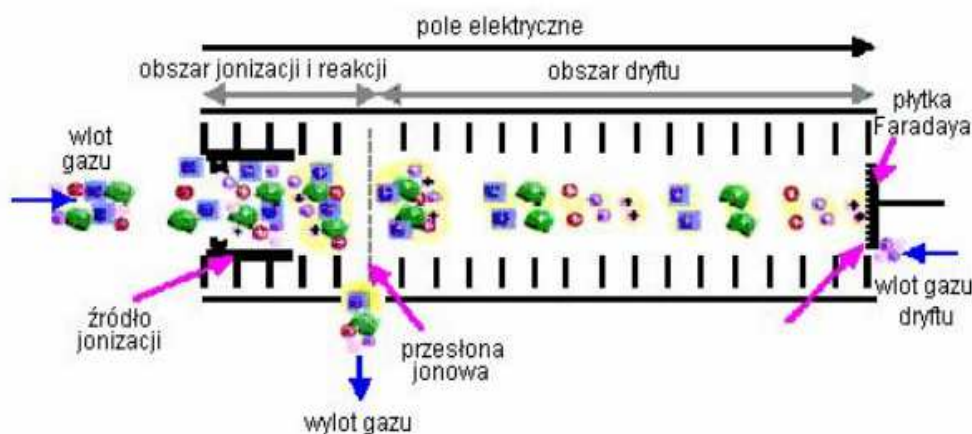
Analiza z zastosowaniem techniki SIFT/MS, opiera się na reakcji jonu reakcyjnego z cząsteczką analitu w ciągu ściśle określonego czasu – rzędu kilku milisekund. Stosowana jest jonizacja chemiczna w strumieniu dodatnich jonów, takich jak: H_3O^+ , NO^+ i O_2^+ , które są wytwarzane w źródle pod wpływem wyładowań elektrycznych. Spośród wszystkich otrzymanych jonów, za pomocą filtra kwadrupolowego, wybierane są kationy o żądanej wartości m/z . Kolejno, wyselekcjonowane jony reakcyjne są wprowadzane w strumień obojętnego gazu nośnego (najczęściej helu) i trafiają do kanału dryftu. Kanał przepływowy stanowi rura o długości od 30 do 100 cm, której panuje ciśnienie ok. 100 Pa i temperatura 300 K. Warunki panujące w kanale powodują, że gaz nośny przepływa przez niego z relatywnie dużą prędkością 40–80 m/s. Do tego kanału, za pomocą cienkiej kapilary, z odpowiednio dobraną prędkością, zasysany jest niewielki strumień gazowej próbki. Aby uniknąć zjawiska kondensacji analitów w kapilarze doprowadzającej, podgrzewa się ją do temperatury ok. 100°C [1,45].

W wyniku szeregu reakcji pomiędzy jonami reakcyjnymi, cząsteczkami wody oraz analitów, tworzą się jony wtórne - kationy charakterystyczne dla analizowanych substancji. Następuje wówczas ubytek jonów reakcyjnych, zaś rośnie stężenie jonów, które ściśle zależy od stężenia początkowego analizowanej substancji znajdującej się w gazie nośnym, czyli od jego ciśnienia cząstkowego. Powstałe podczas różnego rodzaju reakcji – kationy analizowanych związków oraz jony reakcyjne trafiają do analizatora spektrometru, gdzie ulegają rozdzielaniu względem ich stosunku masy do ładunku (m/z). W wyniku pomiarów otrzymuje się widma analizowanych związków chemicznych.

Zastosowanie SIFT/MS pozwala na jednoczesny pomiar stężenia kilku substancji w czasie rzeczywistym [3,46]. Wprawdzie technika nie jest czuła, jak PTR/MS, ale pod jednym względem ma zdecydowaną przewagę - rozróżnia i identyfikuje związki o tej samej masie cząsteczkowej. Dane literaturowe donoszą o szerokim zastosowaniu techniki SIFT/MS w badaniach wydychanego powietrza. Technika znalazła zastosowanie w monitorowaniu stężenia amoniaku, acetonu, izoprenu [5], jak również w badaniach metabolitów. Technika SIFT/MS, rejestrowano zmiany stężeń 2-propanolu w pomieszczeniach szpitalnych [47]. Kolejną aplikacją spektrometru mas w dziedzinie analiz oddechu, było śledzenie metabolizmu etanolu, czy badanie ekspozycji pracowników w miejscach pracy na lotne rozpuszczalniki. Obecnie, jednym z ciekawszych zastosowań spektrometrii mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów jest kontrolowanie cyklu owulacyjnego u kobiet [48].

6.2.4. Spektrometria ruchliwości jonów (IMS)

Spektrometr ruchliwości jonów (*ang. ion mobility spectrometry, IMS*) jest stosunkowo nowym rodzajem detektora, który w ostatnim czasie, coraz częściej znajduje zastosowanie w analizie lotnych związków organicznych w złożonych matrycach gazowych. Podstawą działania detektora jest identyfikacja substancji chemicznych na podstawie pomiaru szybkości jonów badanej substancji. Jony znajdują się w fazie gazowej, a ich ruch odbywa się pod wpływem przyłożonego napięcia (100 – 350V/cm) [1,3,49]. Zasada działania detektora ruchliwości jonów przedstawiono na rysunku 12.



Rys.12. Zasada działania detektora IMS [1,49].

Zaletą detektora IMS jest niski koszt pojedynczej analizy, bardzo krótki czas potrzebny do uzyskiwania wyników analizy – rzędu 20-50 milisekund oraz niska granica detekcji dla wybranych grup związków chemicznych. Dodatkową zaletą jest wygoda i łatwość obsługi. IMS pozwala wykrywać, takie związki chemiczne, jak aldehydy, ketony, aminy, estry są wykrywane na poziomie ng/l. Za pomocą IMS trudno jest wykrywać lotne związki organiczne, które posiadają niskie powinowactwo do protonów, a więc alkanów, czy węglowodorów aromatycznych [45]. Wadą detektora IMS jest niska selektywność względem składników złożonej mieszaniny, rozwiązaniem tej sytuacji jest stosowanie prekolumny chromatograficznej, w której zachodzi wstępny etap rozdzielania analitów. Analizowane substancje opuszczające kolumnę, trafiają do źródła jonów, tam pod wpływem promieniowania β , następuje ich jonizacja. Innym rodzajem jonizacji jest stosowanie wyładowań koronowych lub fotojonizacja za pomocą lasera lub wiązki światła UV. Jako pierwsze do detektora (płytki Faradaya), docierają jony najlżejsze o największym ładunku (o najmniejszym m/z), a następnie jony odpowiednio cięższe. Na płytce Faradaya jony są

zbierane, sygnał wzmacniany i przekazywany jest dalej do rejestratora. Wynikiem rozdzielania jest zależność wytworzonego, przez zgromadzone na płycie jony – prądu, od czasu dryftu. Opisana zależność jest nazywana widmem dryftu (*ang. drift time spectrum*). Czas dryftu jonu, jest parametrem charakterystycznym dla określonego jonu w danych warunkach. Jeżeli do separacji zastosowana jest kolumna chromatograficzna, a detektorem jest IMS, badaną substancję będą charakteryzowały dwa parametry: czas retencji i czas dryftu. Wynikiem analizy będzie mapa topograficzna rozdzielanej mieszaniny składników [1,3,45,49].

System GC/IMS ze względu na liczne zalety, obok zastosowania w bezpośredniej analizie wydychanego powietrza znalazł zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do kontroli, jakości leków, czy też wykrywania środków wybuchowych, bojowych, czy odurzających [3,46].

6.4. Spektroskopia laserowa

Spektroskopia laserowa (*ang. laser diode, LD*) jest częścią spektroskopii zajmującą się oddziaływaniem promieniowania laserowego z materią [1,3,50]. Układy pomiarowe wykorzystujące spektroskopię laserową, pozwalają w sposób ciągły (rzeczywisty) mierzyć stężenia wybranych analitów na poziomie stężeń rzędu ppb. W metodzie spektroskopii laserowej wykorzystywany jest laser, jako źródło promieniowania. Długość fali promieniowania stosowana w laserach obejmuje swoim zakresem zakres promieniowania ultrafioletowego i średniej podczerwieni, co pozwala na rejestrowanie widm badanych substancji w szerokim zakresie. Technika spektroskopii laserowej, charakteryzuje się dużą czułością i selektywnością, oraz niskim kosztem pojedynczej analizy. Istnieje kilka technik opartych na wykorzystaniu światła lasera, które można stosować do analizy lotnych związków organicznych w powietrzu wydychanym, są to m.in.: spektroskopia absorpcyjna z modulowanym laserem diodowym (*ang. tunable diode laser absorption spectroscopy, TDLAS*), spektroskopia strat we wnęce optycznej (*ang. cavity ringdown spectroscopy, CRDS*) [1,51].

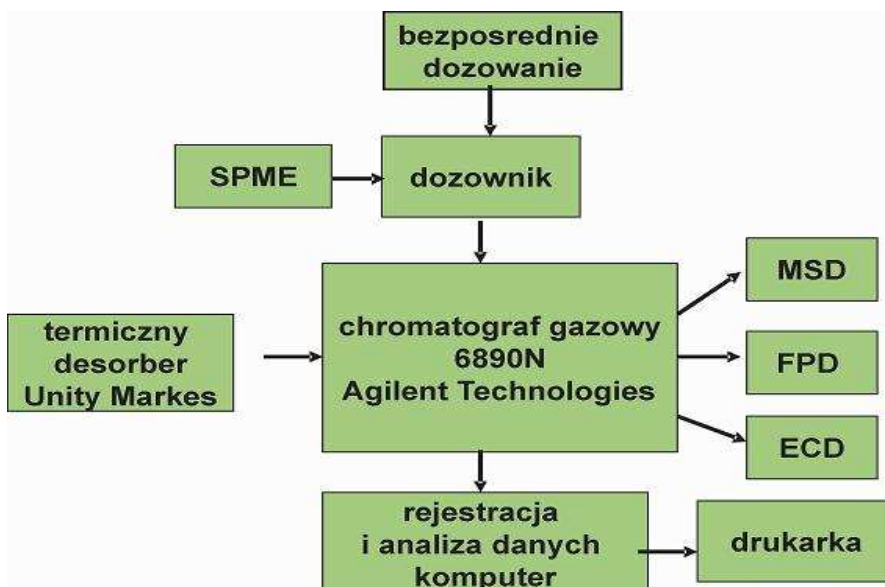
6.3. Elektroniczne nosy

Analizatory zapachów, popularnie zwane sztucznymi nosami, pozwalają na detekcję stężeń rzędu 5ppb [52]. Cząsteczki zapachowe są przechwytywane przez detektor konwertujący sygnał chemiczny na elektryczny, oprogramowanie analizuje sygnał

i porównuje je z wzorcami z bazy danych. W Wielkiej Brytanii rozwijany projekt Diag-Nose, sztuczny nos, diagnozuje zapalenie dróg moczowych. Testy te pozwalają w ciągu 1h wykryć pałeczki okrężnicy *E.coli* i odmieńca *Proteus mirabilis*, z precyzją m.in. 98%. Lekarze przygotowują się do wykorzystania „cybernosów” w diagnostyce zapalenia zatok, gruźlicy, a nawet monitorowania cyklu miesięczkowego u kobiet i okresów płodności. Naukowcy z Università Cattolica del Sacro Cuore w Rzymie analizowali, jaką zdolność diagnostyczną może mieć nos elektroniczny w wykrywaniu astmy. Autorzy pracy ocenili zdolność diagnostyczną elektronicznego nosa na 87,5 % [53]. Na University of Newcastle powstaje tzw. e-nos, wykrywający proteiny i molekuły produkowane przez komórki rakowe, w Carlton University próbuje się przewidzieć zawały serca, wywąchując pierwsze objawy niewydolności układu krążenia. Szkoccy naukowcy, prowadzą badania nad skonstruowaniem urządzenia, rozpoznającego nowotwory, choroby wątroby oraz cukrzycę. Umieszczone w nim elektroniczne czujniki wyłapywać będą określone substancje lotne, które komputer skojarzy z odpowiednimi chorobami. Takie urządzenia mają być przystosowane nie tylko do używania w szpitalach i laboratoriach, ale także w gabinecie lekarza pierwszego kontaktu, czy w domu. Jeśli uda się skonstruować odpowiednio czułe urządzenia potwierdzające trafność wykrywania znajdujących się w wydychanym powietrzu specyficznych biomarkerów, być może walka ze śmiertelnymi chorobami stanie się skuteczniejsza, bo będzie można je wykrywać na wcześniejszym etapie rozwoju.

7. UKŁAD POMIAROWY STOSOWANY W BADANIACH ODDECHU W IFJ PAN

Na rysunku 13 przedstawiono schemat blokowy chromatografu gazowego sprzężony ze spektrometrem mas (GC/MS) firmy *Agilent Technologies*, działający w Zakładzie Fizykochemii Ekosystemów IFJ PAN Kraków.



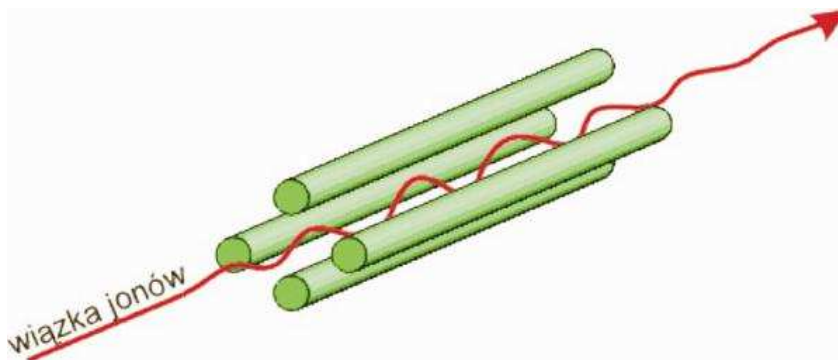
Rys. 13. Schemat blokowy GC/MS zastosowany do badań oddechu w IFJ PAN.

Na rysunku 14 przedstawiono widok układu pracującego w laboratorium IFJ PAN.



Rys.14. Chromatograf gazowy (1) sprzężony ze spektrometrem mas MS (2), wyposażony dodatkowo w detektor płomieniowo - fotometrycznym (3) oraz detektor wychwytu elektronów (4). Dodatkowo zaznaczono dozownik SPME (5) linię transferową (6) łączącą termiczny desorber (7) z GC.

Chromatograf gazowy wyposażony jest w spektrometr masowy. Analizatorem odpowiedzialnym za rozdział jonów o różnym stosunku masy do ładunku m/z , w przypadku naszego spektrometru jest kwadrupolowy analizator mas (rysunek 15). Jego zasada działania została opisana w rozdziale 6.1.4.



Rys.15 Kwadrupolowy analizator mas [38].

Chromatograf gazowy został dodatkowo wyposażony w detektor płomieniowo-fotometryczny (FPD) oraz detektor wychwytu elektronów (ECD). Detektor FPD został zainstalowany, jako detektor zalecany w analizie związków siarkowych, natomiast detektor ECD, jako bardzo czuły na związki chlorowcopochodne. Detektor masowy (MS) może pracować w trybie mieszanym SIM/SCAN. Tryb SCAN stosuje się w celu identyfikacji analizowanych związków, tryb SIM do analizy ilościowej. Praca w trybie SIM wymaga wskazania jonów fragmentacyjnych charakterystycznych dla analizowanych związków. Tabela 6 zawiera wybrane jony fragmentacyjne charakterystyczne dla związków siarkowych.

Tabela 6. Jony (m/z) wybrane do oznaczania badanych związków w trybie SIM-MS.

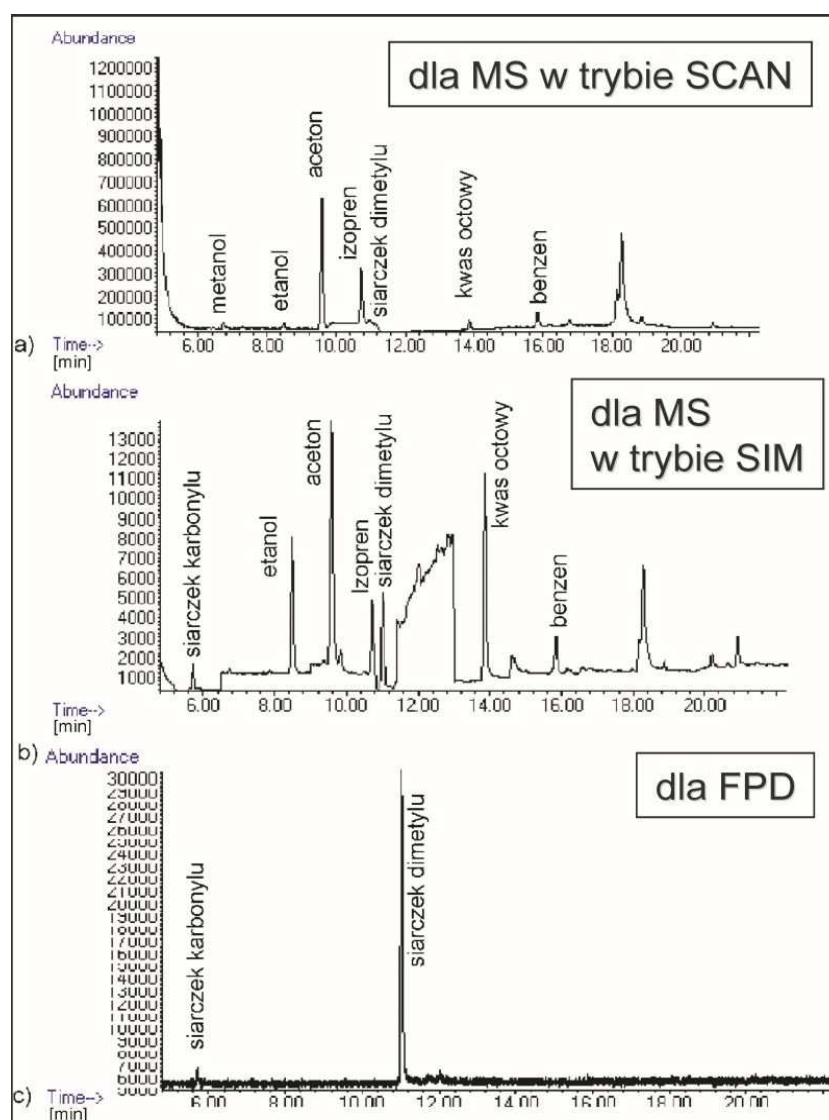
analizowany związek		m/z
nazwa	wzór chemiczny	
siarkowodór	H ₂ S	33, 34
siarczek karbonylu	COS	60, 62
metanotiol	CH ₃ SH	45, 47, 48
etanotiol	C ₂ H ₅ SH	29, 47, 62
siarczek dimetylu	(CH ₃) ₂ S	47, 61, 62
disiarczek węgla	CS ₂	44, 76, 78

W tabeli 7 porównano poziomy detekcji uzyskane dla związków siarkowych przy zastosowaniu detektora masowego (w trybie SIM) oraz detektora FPD. Jako technikę wzbogacania zastosowano termiczną desorpcję.

Tabela 7. Poziomy detekcji dla analizowanych związków siarkowych.

analizowany związek		czas retencji [min]	Poziom detekcji LOD [ppb]	
nazwa	wzór chemiczny		SIM-MS	FPD
siarczek karbonylu	COS	5,7	0,50	15,8
metanotiol	CH ₃ SH	7,9	0,70	17,5
etanotiol	C ₂ H ₅ SH	10,5	0,10	9,8
siarczek dimetylu	(CH ₃) ₂ S	11,1	0,06	3,0
disiarczek węgla	CS ₂	12,0	0,05	1,5

Poniżej zamieszczono chromatogramy ludzkiego oddechu zarejestrowane z wykorzystaniem metody do oznaczania związków siarkowych.



Rys.14 Chromatogramy zarejestrowane z próbki oddechu osoby zdrowej, z zastosowaniem techniki termicznej desorpcji (adsorpcja 200 ml próbki – sorbent- węglowe sita molekularne) [24].

Temperatura pracy detektora FPD wynosiła 240°C, przepływ H₂ 50 ml/min, powietrza 60 ml/min. Anality były rozdzielane na kolumnie kapilarnej DB-1 (60m x 0,32 mm, pokrytej fazą dimetylopolisiloksanu o grubości 5 μm). Kolumna pracowała w trybie stałociśnieniowym. Temperatura początkowa pieca chromatograficznego wynosiła 60°C i była utrzymywana przez 6 min, po czym następował narost temperatury do 230°C z szybkością 15°C/min, następnie przez 5 min. w izotermie w temperaturze 230°C. 200 ml próbki oddechu było zatężane na rurce wypełnionej sorbentem (węglowe sita molekularne).

Detekcja polarnych związków sprawia analitykom wiele trudności. Dla poprawy poziomu wykrywalności oraz osłabienia niektórych właściwości badanego analitu (np. polarności) stosuje się konwersję badanego związku w jego pochodną – nową substancję, która będzie łatwiejsza w detekcji. W tym celu bardzo często stosuje się reagenty zawierające w swojej cząsteczce atomy chloru lub fluoru (np. konwersja amin drugorzędowych za pomocą bezwodnika kwasu trifluorooctowego). W detekcji takich związków doskonale sprawdza się detektor ECD [54,55].

8. PODSUMOWANIE

Analiza składu wydychanego powietrza wydaje się być doskonałą, alternatywą do kosztownych, trudno dostępnych, inwazyjnych i często rozłożonych w czasie typowych metod diagnostycznych. Obiecujące wyniki poszukiwania związków, które mogą być potencjalnymi markerami w niedalekim czasie mogą pozwolić na uzyskanie narzędzia do wykrywania i monitorowania przebiegu wielu chorób. Innym obiecującym obszarem badań dla tego rodzaju testów jest monitorowanie leków. Chromatografia gazowa wraz z metodami zatężania próbek jest doskonałą metodą monitorowania ekspozycji pracowników przemysłu na szkodliwe dla zdrowia rozpuszczalniki oraz na środki chemiczne stosowane w przemyśle petrochemicznym. Możliwości zastosowania testów oddechowych i ich przydatność w praktyce klinicznej wydają się być ogromne. Analiza składu wydychanego powietrza niesie ze sobą duży potencjał diagnostyczny, ponieważ dostarcza cennych informacji o wielu procesach biochemicznych zachodzących w organizmie. Lotne substancje produkowane zarówno przez zdrowe, jak i zmienione chorobowo komórki, przedostają się do krwi, a następnie do płuc, zatem możliwe jest określenie profilu oddechowego osoby „zdrowej” i osoby ze zdiagnozowaną jednostką chorobową. Wiedział już o tym Hipokrates, pisząc, że „skład wydychanego powietrza zdrowego i chorego człowieka, różni się znacząco”. Współcześni naukowcy, przy użyciu nowoczesnych metod analitycznych, starają się wyjaśnić na ile różnica pomiędzy składem wydychanego powietrza u osoby zdrowej i chorej jest wykrywalna i cenna pod względem diagnostycznym. Potrzeba stworzenia „nowoczesnego narzędzia diagnostycznego”, w postaci testu oddechowego, jest szczególnie istotna w przypadku chorób, które w swojej początkowej fazie przebiegają bezobjawowo. Do takich schorzeń zalicza się m.in. przewlekłą chorobę nerek i cukrzycę. Opracowując przydatny diagnostycznie test, konieczne jest przebadanie zdiagnozowanej wcześniej grupy pacjentów z daną jednostką chorobową, w celu wytypowania związku, bądź grupy związków charakterystycznych. Potrzebne jest również znalezienie korelacji pomiędzy wykrywanymi w wydychanym powietrzu związkami, a reakcjami biochemicznymi przebiegającymi w danym szlaku metabolicznym.

Wyrażamy nadzieję, że już w niedalekiej przyszłości testy oddechowe, z przedmiotu dociekań naukowców, staną się rutynową metodą praktyki lekarskiej. Przy obecnym stanie wiedzy i tempie rozwoju nowoczesnych technik analitycznych jest to zapewne kwestią niedalekiej przyszłości.

Podziękowania

Autorzy pracy pragną podziękować Prof. A. Ammanowi z Research Institute Austrian Academy of Sciences z Innsbrucka za merytoryczne wsparcie w opracowywaniu analitycznych procedur badania ludzkiego oddechu oraz Prof. B. Buszewskiemu z Uniwersytetu w Toruniu za konsultacje w problematyce śladowych analiz chromatograficznych. Za merytoryczne dyskusje i udział w badaniach autorzy dziękują Dr Pawłowi Mochalskiemu z IFJ PAN.

Prace badawcze były finansowane w ramach projektu EU BAMOD w latach 2006-2009 kiedy to nastąpiła współpraca IFJ PAN z europejskimi ośrodkami wiodącymi w analizie oddechu (Innsbruck, Dortmund, Rožtok,), co umożliwiło poznanie omówionych w raporcie metod analitycznych użytecznych w analizie oddechu (PT/RM, SIFT/MS, IMS). W ramach projektu BAMOD opracowano procedury pobierania i przechowywania próbek oddechu dla chromatograficznego oznaczania związków siarkowych oraz amin alifatycznych w próbkach gazowych.

Badania oddechu były też finansowane w ramach dwóch grantów z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania lotnych związków siarki w wydychanym powietrzu”, nr N N404 2793 33 w latach 2007-2009 oraz „Opracowanie chromatograficznej metody oznaczania dimetyloaminy i trimetyloaminy w próbkach gazowych w celach diagnostyki medycznej”, nr NN204 1251 37 w latach 2010-2011.

9. LITERATURA

1. A. Ulanowska, *Sprężone techniki separacyjne w oznaczaniu biomarkerów stosowanych do wczesnego wykrywania chorób nowotworowych*, Praca doktorska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń (2011)
2. W. Miekisch, J.K. Schubert, G.F.E. Noeldge-Schomburg, *Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds*. Clin. Chim. Acta, 347 (2004) 25-39.
3. A. Amann, D. Smith [red.], *Breath analysis for clinical diagnosis and therapeutic monitoring*. World Scientific, Singapore (2005).
4. S. Konturek, *Fizjologia człowieka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków (2001).
5. T. Ligor, *Analityka wydychanego powietrza z zastosowaniem sprzężonych technik chromatograficznych z przeznaczeniem do badań przesiewowych chorób płuc*, Rozprawa habilitacyjna, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń (2011)
6. B. Moser, F. Bodrogi, G. Eibl, M. Lechner, J. Rieder, P. Lirk, *Mass spectrometric profile of exhaled breath – field study by PTR-MS*. Respiratory Physiol. Neurol., 145 (2005) 295-300.
7. M. Phillips, *Testy wydychanego powietrza w medycynie*, Świat Nauki, 9 (1992), 52-59.
8. P. Montuschi, J.A. Nightingale, S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, *Ozone-induced increase in exhaled 8-isoprostane in healthy subjects*. Free Radic Biol Med 33 (2002) 1403-8.
9. W. Filipiak et al. *Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants*. J. Breath Res. 6 036008 (2012).
10. A. Bajtarevic et al. *Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath*. BMC Cancer, 9 (2009) 348-324.
11. M. Ligor et al. *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., 47(5) (2009) 550-560.
12. M. Phillips, K. Glesson, J.M.B. Hughes, J. Greenberg, R.N. Cataneo, L. Baker, W.P. McVay, *Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study*. Lancet 353 (1999) 1930-33
13. N. Teshima, J. Li, K. Toda, P. K. Dasgupta, *Determination of acetone in breath*. Analytica Chimica Acta, 535 (2005) 189-199.
14. T.H. Risby, S.F. Solga, *Current status of clinical breath analysis*. Appl. Phys. B, 85 (2006) 421-426.
15. W. Miekisch, J.K. Schubert, *From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: Technical development in breath analysis*. Trends in Anal. Chem., 25 (2006) 665-673.
16. D.T.V. Anh, W. Olthuis, P. Bergveld, *A hydrogen peroxide sensor for exhaled breath measurement*. Sensors and Actuators B: Chemical 111-112 (2005) 494-99.
17. E.P. Solomon, L.R. Berg, D.W. Martin, *Biologia*, Multico Oficyna Wydawnicza, Warszawa (1996)
18. P. O'Neill, *Chemia środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Wrocław 1997
19. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, *Fizykochemiczne metody kontroli zanieczyszczeń środowiska*, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 1998

20. W. Wardencki, *Problems with the determination of environment al sulphur compounds by gas chromatography*. J. Chromatography A., 793 (1998) 1-19.
21. P. Mochalski, B. Wzorek, I. Śliwka, A. Amann, *Suitability of different polymer bags for storage of volatile sulphur compounds relevant to breath analysis*. J. Chromatogr. B, 877 (2009) 189-196.
22. P. Mochalski, B. Wzorek, I. Śliwka, A. Amann, *Improved preconcentration and detection methods for volatile sulphur breath constituents*. J. Chromatogr. B, 877 (2009) 1856-66.
23. B. Wzorek, P. Mochalski, I. Śliwka, A. Amann, *Application of GC-MS with SPME and thermal desorption technique for determination of dimethylamine and trimethylamine in gaseous samples for medical diagnostics purposes*. J. Breath Res., 4 026002 (2010).
24. B. Wzorek, P. Mochalski, M. Skowron I. Śliwka,, J. Lasa, *Chromatograficzne oznaczanie lotnych związków siarki w wydychanym powietrzu z zastosowaniem sorbentów węglowych, Węgiel aktywny w ochronie środowiska i w przemyśle*, praca zbior. pod red. Z. Dębowskiego, Częstochowa 2008, str.328-337, ISBN 978-83-7193-377-6.
25. C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*. Anal. Chem., 62 (1990) 2145-48.
26. K. Dettmer, W. Engewald, *Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds*. Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002) 490-500
27. Z. Witkiewicz, J. Hetper, *Chromatografia gazowa*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2001.
28. T. Ligor, *Analytical methods for breath investigation*. Crit. Rev. Anal. Chem., 39 (2009) 2-10
29. K. Dettmer, Th. Knobloch, W. Engewald, *Stability of reactive low boiling hydrocarbons on carbon based adsorbents typically used for adsorptive enrichment and thermal desorption*. J. Anal. Chem., 366 (2000) 70-78.
30. M.D. Knutson, FE. Viteri, *Concentrating breath samples using liquid nitrogen, a reliable method for simultaneous determination of ethane and pentane*. Anal. Biochem., 242 (1996) 29-135.
31. J. Namieśnik, Z. Jamrógiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa 2000.
32. Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa 2005.
33. J. Lasa, I. Śliwka, *Monografia Detektory w chromatografii gazowej i niektóre ich zastosowania w analizach śladowych.*, Instytut Fizyki Jądrowej PAN, Kraków 2006, ISBN 83-908998-6-8.
34. C.F. Poole, S.A. Schuette, *Contemporary practice of chromatography*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York (1984) 1-708.
35. C.M. Kneepkens, C. Ferreira, G. Lapage, C.C. Roy, *The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice*. Clin Invest Med. 15(2), (1992) 163-86.
36. D. Kiedlik, *Badanie zawartości n-pentanu w powietrzu wydychanym w celach diagnostycznych*. Praca dyplomowa WFiTJ AGH Kraków, (1995) 1-50.

37. I. Śliwka, *Detektor wychwytu elektronów - podstawy teoretyczne i przykłady zastosowań*, Raport IFJ PAN Nr.1924/AP, (2003) www.ifj.edu.pl/reports/2003.html.
38. Robert A.W. Johnstone, M.E. Rose, *Spektrometria mas*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
39. A. Amann, P. Spanel, D. Smith, *Breath analysis, the approach towards clinical applications*. Mini Rev. Med. Chem., 7 (2007) 115-129.
40. R. Blake, R. Whyte, et al, *Demonstration of proton transfer reaction time of flight mass spectrometry for real time analysis of trace volatile organic compounds*. Anal. Chem., 76 (2004) 3841-3845.
41. A. Hansel, A. Jordan, R. Holzinger, et al, *PTR – MS on-line trace gas analysis at the ppb level*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process., 149/150 (1999) 609 – 619
42. W. Lindinger, A. Hansel, A. Jordan, *Proton – transfer reaction mass spectrometry, on line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels*. Chem. Soc. Rev., 27 (1998) 347-54.
43. W. Lindinger, A. Hansel, A. Jordan, *On line monitoring of volatile organic compounds at ppt levels by means of PTR-MS. Medical applications, food control and environmental research*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 173 (1998) 191-241
44. D. Smith, P. Spanel, *Selected ion flow tube mass spectrometry for on line trace gas analysis*. Mass Spectrom. Rev., 24 (2005) 661-700
45. B. Buszewski, T. Ligor, A. Ulanowska, in I. Baranowska (Editor), *Analiza śladowa*, Malamut, Warszawa, 2011
46. P. Spanel, A.M. Diskin, S.M. Abbott, T. Wang, D. Smith, *Quantification of volatile compounds in the headspace of aqueous liquid using selected ion flow tube mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 16 (2002) 2148-2153.
47. T.S. Wang, et al., *The analysis of 1-propanol and 2-propanol in humid air samples using selected ion flow tube mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 20 (2006) 125-130.
48. A. M. Diskin, et al., *Increase of acetone and ammonia in urine headspace and breath during ovulation quantified using selected ion flow tube mass spectrometry*. Physiol. Meas., 24 (2003) 191-199.
49. J.I. Baumbach, *Process analysis using ion mobility spectrometry*. Anal Bioanal Chem. 384 (2006) 1059-1070.
50. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004
51. C. Wang, P. Sahay, *Breath Analysis Using Laser Spectroscopic Techniques: Breath Biomarkers, Spectral Fingerprints, and Detection Limits*, Sensors, 9 (2009) 8230-62.
52. J. Chrostowski, *Sztuczne nosy*, Wiedza i Życie, 2 (2006)
53. www.naukawpolsce.pap.pl/
54. E.E. Stashenko, J.R. Martinez, *Derivatization and solid phase microextraction*, Trends, Anal. Chem. 23 (2004) 553–61.
55. H. Kataoka, *Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 19–34.