

**Tomasz Ligor**

**Analityka wydychanego powietrza  
z zastosowaniem  
sprzężonych technik chromatograficznych  
z przeznaczeniem  
do badań przesiewowych chorób płuc**



WYDANICTWO NAUKOWE  
UNIWERSYTETU W BIAŁYMOSTKU

Toruń 2011

**UNIwersYTET MIKOŁAJA KOPERNIKA**

ROZPRAWA HABILITACYJNA

**Tomasz Ligor**

**Analityka wydychanego powietrza  
z zastosowaniem  
sprzężonych technik chromatograficznych  
z przeznaczeniem  
do badań przesiewowych chorób płuc**



WYDAWNICTWO NAUKOWE  
UNIwersYTETU MIKOŁAJA KOPERNIKA

Toruń 2011

Recenzenci  
*Adam Grochowalski*  
*Irena Staneczko-Baranowska*

Projekt okładki  
*Krzysztof Skrzypczyk*

Opracowanie redakcyjne i korekta  
*Andrzej Piotr Lesiakowski*

Printed in Poland  
© Copyright by Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika  
Toruń 2011

ISBN 978-83-231-2631-7

Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika  
Redakcja: ul. Gagarina 5, 87-100 Toruń  
tel. (56) 611 42 95; fax (56) 611 47 05  
e-mail: wydawnictwo@umk.pl

Dystrybucja: ul. Reja 25, 87-100 Toruń  
tel./fax (56) 611 42 38  
e-mail: books@umk.pl, www.wydawnictwoumk.pl

Wydanie I

Opracowanie techniczne  
*Dariusz Żulewski, tel. 666 041 858*

Druk: Wydawnictwo Naukowe UMK  
ul. Gagarina 5, 87-100 Toruń

# Spis treści

Wykaz najważniejszych skrótów i oznaczeń .....	7
Wprowadzenie .....	9
1. Budowa i fizjologia układu oddechowego .....	13
2. Skład wydychanego powietrza .....	17
2.1. Biosynteza acetonu .....	19
2.2. Biosynteza izoprenu .....	20
2.3. Węglowodory i stres oksydacyjny .....	22
2.4. Alkohole i aldehydy .....	24
2.5. Związki siarki .....	24
2.6. Inne składniki wydychanego powietrza .....	24
3. Pobieranie próbek wydychanego powietrza .....	27
4. Metody stosowane w analizie wydychanego powietrza .....	31
4.1. Naczynia do pobierania i transportu .....	31
4.2. Metody wydzielania i wzbogacania analitów z próbek wydychanego powietrza .....	32
4.3. Techniki wykorzystujące złoża sorbentów .....	32
4.4. Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) .....	34
4.5. Derywatywacja z zastosowaniem SPME .....	34
4.6. Techniki analityczne .....	35
4.7. Pełna wielowymiarowa chromatografia gazowa (GC×GC) .....	36
4.8. Spektrometria mas z jonizacją przez przeniesienie protonu (PTR MS) .....	36
4.9. Spektrometria mas z jonizacją w strumieniu wybranych jonów (SIFT MS) .....	38
4.10. Spektroskopia laserowa i układy sensorowe .....	39
5. Cel pracy .....	41
6. Metodyki pomiarów .....	45
6.1. Przygotowanie wzorców do kalibracji .....	45

---

6.2. Analizy powietrza wydychanego .....	46
6.3. Badanie tkanek .....	47
7. Walidacja .....	49
8. Badanie składu powietrza wydychanego u osób zdrowych .....	57
8.1. Badanie składu powietrza wydychanego pochodzącego od osób palących i niepalących .....	63
9. Skład powietrza wydychanego przez chorych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc .....	67
10. Identyfikacja lotnych związków organicznych obecnych w wydychanym powietrzu pobieranym od pacjentów z nowotworami płuc .....	77
10.1. Substancje, które zakwalifikowano jako egzogenne .....	91
10.2. Lotne związki organiczne specyficzne dla pacjentów z nowotworem płuc .....	93
11. Emisja lotnych związków organicznych z tkanek nowotworowych .....	95
11.1. Powietrze wydychane .....	95
11.2. Badanie emisji LZO z tkanek w układzie HS SPME .....	98
12. Badania substancji lotnych wydzielanych przez komórki nowotworowe .....	103
Podsumowanie .....	107
Literatura .....	109
Abstract .....	135

## Wprowadzenie

Umiejętność oceny stanu chorego na podstawie wydzielanych zapachów stało się jedną z użytecznych metod w dawnej medycynie. Medycy chińscy twierdzili, że tocząca choroba zaburza równowagę w organizmie i doprowadza do zmiany zapachu ciała, wydychanego powietrza, a także jego wydzielin (mocz, ślina, pot). W starożytnej Europie Hipokrates powiązał charakterystyczne zapachy z chorobami. Twierdził, że powietrze wydychane przez człowieka chorego ma odmienny zapach niż zdrowego.

Zainteresowanie chemią pozwoliło na wykonanie pierwszych badań składu wydychanego powietrza. Pionierem w tej dziedzinie był A. Lavoisier, który ustalił, że ludzie i zwierzęta wdychają tlen, a wydzielają ditlenek węgla podczas wydechu [1]. Natomiast współczesne badania nad wydychanym powietrzem były możliwe dzięki rozwojowi chromatografii gazowej. W 1971 r. Linus Pauling przedstawił wyniki pionierskich badań dotyczących składu powietrza wydychanego, wykazując obecność ponad 200 lotnych związków organicznych [2]. Zapoczątkowało to wzrost zainteresowania badaniem lotnych związków organicznych (LZO) w powietrzu wydychanym. Także twierdzenie, że endogenne substancje obecne w wydychanym powietrzu są produktami procesów biochemicznych zachodzących w komórkach, stało się impulsem do badań powietrza wydychanego. Od wielu stuleci różnym chorobom towarzyszą charakterystyczne zapachy, np. woń gnijących jabłek związana jest z cukrzycą, surowego mięsa z żółtą febrą czy zepsutych ryb z mocznicą i niewydolnością nerek. W literaturze można znaleźć doniesienia dotyczące oceny poziomu stężenia acetonu w wydychanym powietrzu u chorych z cukrzycą, izoprenu

w przypadku hipercholesterolemii, lotnych związków siarki w chorobach wątroby czy amin w chorobach nerek [3–5]. Oczywiście w dobie nowoczesnej medycyny, testów laboratoryjnych i zaawansowanej techniki „zapach choroby” przestał być kojarzony z diagnozą lekarską. Jednakże w ciągu ostatnich kilkunastu lat obserwuje się wzrost zainteresowania badaniami dotyczącymi składu wydychanego powietrza [6]. Wynika to z rozwoju chemii analitycznej, w szczególności chromatografii gazowej (GC) i spektrometrii mas (MS) oraz metod wzbogacania analitów, który umożliwia identyfikację coraz większej liczby składników zawartych w wydychanym powietrzu. Nowoczesne techniki analityczne, takie jak chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS), laserowa spektroskopia optyczna, spektrometria mas z jonizacją przez przeniesienie protonu (PTR MS) oraz spektrometria ruchliwości jonów (IMS), pozwalają na identyfikację substancji organicznych i nieorganicznych oraz śledzenie składu wydychanego powietrza [7]. Różne właściwości analizowanych substancji wymagają często użycia wzajemnie uzupełniających się technik, np. GC/MS i PTR MS. Mimo ogromnego postępu w tej dziedzinie do tej pory wdrożono niewiele testów oddechowych. Ocena stężenia etanolu w powietrzu wydychanym po spożyciu alkoholu, diagnostyka zakażeń *H. pylori* po podaniu znakowanego mocznika i określenie stosunku izotopowego  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  w wydychanym  $\text{CO}_2$  [8–12], ocena rozwoju astmy na podstawie stężeń tlenków azotu [13] to nieliczne przykłady, które mają zastosowanie medyczne.

Bardzo ograniczone wykorzystanie LZO obecnych w wydychanym powietrzu do przesiewowego wykrywania chorób jest spowodowane szeregiem czynników. Związane są one przede wszystkim z pobieraniem próbek powietrza oraz etapem wzbogacania analitów. Jednakże najbardziej krytycznym zagadnieniem w analizie powietrza wydychanego wydaje się obecność substancji egzogennych, będących niejednokrotnie przyczyną błędnej interpretacji wyników. Sytuację komplikuje dodatkowo fakt, że biosynteza LZO w organizmie człowieka jest procesem wieloetapowym, a szlaki metaboliczne zostały określone tylko dla nielicznej grupy związków.

Przedmiotem pracy jest przedstawienie wyników badań dotyczących identyfikacji lotnych związków organicznych obecnych w powietrzu wydychanym przez osoby zdrowe i pacjentów ze schorzeniami płuc, w tym także z nowotworami. Istotną część badań stanowiła analiza ilościowa oraz walidacja zastosowanych metod analitycznych. Ważnym zagadnieniem było oznaczenie LZO wydzielanych przez hodowane komórki nowotworowe oraz tkanki nowotworowe. W badaniach wykorzystano chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas jako technikę detekcji i identyfikacji w oznaczeniach lotnych analitów.



Autor pragnie serdecznie podziękować Panu prof. dr. hab. Bogusławowi Buszewskiemu za wprowadzenie w świat chromatografii i naukowe dyskusje.



# 1. Budowa i fizjologia układu oddechowego

Wymiana gazowa między krwią a powietrzem zachodzi w pęcherzykach płucnych znajdujących się na końcu drzewa tchawiczo-oskrzelowego. U dorosłego człowieka całkowita powierzchnia oskrzelików wynosi około  $70 \text{ m}^2$ . Powietrze wewnątrz pęcherzyków płucnych oddzielone jest od krwi barierą o grubości kilku  $\mu\text{m}$ . Pęcherzyki oplecione są siecią naczyń włosowatych, co zapewnia skuteczną wymianę gazów. Zgodnie z prawem Daltona ciśnienie wywierane przez mieszaninę gazów ( $p_B$ ) jest równe sumie ciśnień cząstkowych (parcjalnych) każdego z gazów w powietrzu atmosferycznym:

$$p_B = p_{N_2} + p_{O_2} + p_{CO_2} + p_{H_2O} + p_i \quad (1)$$

gdzie:  $p_{N_2}$  – ciśnienie parcjalne azotu,  $p_{O_2}$  – ciśnienie parcjalne tlenu,  $p_{CO_2}$  – ciśnienie parcjalne ditlenku węgla,  $p_{H_2O}$  – ciśnienie parcjalne pary wodnej,  $p_i$  – ciśnienie parcjalne pozostałych gazów w powietrzu.

Przyjmując zawartość tlenu i azotu w powietrzu atmosferycznym na 21% oraz 78% i pomijając zawartość pozostałych gazów, można określić ciśnienie parcjalne tlenu ( $p_{O_2}$ ), które wynosi 160 mmHg, a  $p_{N_2}$  – 600 mm Hg. Podczas wdychania powietrza jest ono nagrzewane, nawilżane oraz miesza się z powietrzem znajdującym się w drogach oddechowych. W konsekwencji zmieniają się ciśnienia parcjalne gazów, więc  $p_{O_2}$  wynosi 102 mmHg,  $p_{N_2}$  – 571 mmHg,  $p_{CO_2}$  – 40 mmHg, a  $p_{H_2O}$  – 47 mmHg.

Tlen z powietrza przenika na drodze dyfuzji przez błonę pęcherzykową do krwi płucnej dzięki różnicy ciśnień parcjalnych gazów po obu stronach błony pęcherzykowej. W powietrzu pęcherzykowym ciśnienie parcjalne tlenu jest wyższe (102 mmHg) niż we krwi żyłnej włosniczek (40 mmHg). W przeciwnym kierunku, tj. z osocza i krwinek czerwonych do światła pęcherzyków płucnych, dyfundują cząsteczki ditlenku węgla. Ciśnienie parcjalne  $\text{CO}_2$  w powietrzu pęcherzykowym (40 mmHg) jest mniejsze niż we krwi żyłnej (46 mmHg) [14].

W warunkach fizjologicznych powietrze pęcherzykowe może zawierać różne ilości LZO, które dyfundują z krwi przez płucną błonę pęcherzykową, zgodnie z gradientem ciśnień parcjalnych. W wydychanym powietrzu mogą pojawiać się zatem związki, które wykazują odpowiednio wysoką prężność par [15].

Z punktu widzenia fizjologii układu oddechowego wydalanie LZO jest bezpośrednio związane z szybkością wentylacji i pojemnością minutową serca (*cardiac output*). Na kinetykę wydalania LZO wpływa także depozycja w tkankach [3]. Natomiast, biorąc pod uwagę właściwości cząsteczek, o wydalaniu gazów z organizmu decyduje masa cząsteczkowa, wartość stałej Henry'ego i hydrofobowość związków [16].

Całkowita pojemność płuc mężczyzny o masie 70 kg wynosi ok. 6 dm<sup>3</sup>. Jednakże średnia objętość oddechowa wynosi ok. 0,5 dm<sup>3</sup> (TV). Tylko taka objętość powietrza jest wprowadzana do płuc i usuwana z każdym wydechem w trakcie spoczynku. W płucach znajduje się dalej pewna ilość powietrza, którą można usunąć, wykonując maksymalny wydech – zapasowa objętość wydechowa (ERV) stanowi ok. 1,2 dm<sup>3</sup>. Jednak nawet podczas maksymalnego wydechu w płucach znajduje się nadal pewna objętość gazu – objętość zalegająca (RV). Wykonując natomiast maksymalny wdech, można wciągnąć do płuc dodatkowo 3 dm<sup>3</sup> powietrza – jest to zapasowa objętość wdechowa (IRV). Pojemność życiowa płuc (VC) równa więc jest sumie:

$$VC = IRV + TV + ERV \quad (2)$$