

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní obor- Klinická a toxikologická analýza



Veronika Pospíšilová

Hmotnostní spektrometrie pro analýzu dechu v klinické diagnostice

Mass spectrometry for breath analysis in clinical diagnosis

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Kristýna Sovová

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Mgr. Kristýny Sovové a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Veronika Pospíšilová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Mgr. Kristýně Sovové za výborné vedení při vypracování této bakalářské práce, za poskytnutí konzultací a za ochotnou pomoc při experimentální části. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Kseniye Dryahině, Ph. D a prof. RNDr. Patriku Španělovi za velmi cenné rady a připomínky k této práci. Dík patří také mé rodině za její podporu během mého studia.

Klíčová slova

Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty

Analýza dechu

Zánětlivá střevní onemocnění

Pentan

Keywords

Selected ion flow tube mass spectrometry

Breath analysis

Inflammatory bowel disease

Pentane

Obsah

1 Úvod	7
2 Teoretická část	8
2.1 Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty- SIFT-MS	8
2.1.1. Princip SIFT-MS	8
2.1.2 Reakce jednotlivých prekurzorů.....	10
2.1.3. Výpočet absolutní koncentrace	11
2.1.4. Využití SIFT-MS.....	12
2.2 Analýza dechu.....	13
2.3. Pentan v dechu jako biomarker zánětlivých střevních onemocnění	14
3 Experimentální část	16
3.1 Iontová chemie pentanu – stanovení rychlostní konstanty a iontových produktů 16	
3.2 Měření koncentrace pentanu v lidském dechu	17
3.3 Měření koncentrace exogenního pentanu v lidském dechu	18
4 Výsledky	19
4.1 Iontová chemie pentanu – stanovení rychlostní konstanty a iontových produktů 19	
4.2. Měření koncentrace pentanu v lidském dechu	24
4.2.1. Hmotnostní spektra dechu zdravého jedince	24
4.2.2. Měření koncentrace pentanu v dechu dobrovolníků	26
4.2.3 Měření koncentrace pentanu v dechu pacientů s IBD.....	27
4.3. Měření koncentrace exogenního pentanu v lidském dechu	29
5 Závěr	32
Literatura	33

Seznam zkratek

CD	Crohn disease - Crohnova choroba
IBD	Inflammatory bowel disease - Zánětlivá střevní onemocnění
MIM	Multiple ion monitoring mód
n_0	Loschmidtovo číslo $2.687 \times 10^{19} \text{ cm}^{-3}$
NIST	National Institute of Standards and Technology - Národní Institut Standardů a Technologie
OSHA	Occupational Safety and Health Administration - Agentura pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci
PEL	Permissible exposure limits - Přípustné expoziční limity
p_0	Standardní atmosférický tlak 760 Torr
ppm	Parts-per-million
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SIFT-MS	Selected ion flow tube mass spectrometry - Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty
T_0	Absolutní teplota 273,15K
T_g	Teplota nosného plynu
UC	Ulcerative colitis – Ulcerativní kolitida

1 Úvod

Analýza dechu se stává velmi atraktivní metodou klinické diagnostiky. Důvodem je zejména jednoduchost při odběru vzorku a neinvazivnost tohoto procesu. Principem je kvantifikace těkavých metabolitů v dechu, které mohou sloužit jako biomarkery určitých onemocnění. Tyto metabolity se v dechu vyskytují ve stopových koncentracích (v řádech ppm a menších), takže jejich měření lze provést jen díky nejmodernějším analytickým metodám, zejména hmotnostní spektrometrii. Metoda SIFT-MS, neboli hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty (Selected ion flow tube mass spectrometry), se jeví jako jedna z nejvhodnějších pro absolutní kvantifikaci těchto metabolitů v dechu. Její výhodou je analýza vzorku v reálném čase, což znamená okamžité informace pro potencionálního klinického pracovníka. V porovnání s doposud nejvíce používanou GC-MS, není nutné provádět kalibraci ani sbírat vzorky lidského dechu. To celý proces měření zjednodušuje, zrychluje a omezuje případnou kontaminaci vzorku.

V této práci je zkoumaným metabolitem v lidském dechu uhlovodík pentan, který byl doposud měřen pouze GC-MS. Pentan vzniká při peroxidaci ω -6 mastných kyselin, způsobené volnými radikály kyslíku. Tento proces hraje významnou roli v zánětlivých střevních onemocněních (IBD – Inflammatory Bowel disease), neboť právě zvýšená míra peroxidace lipidů způsobuje poškození tkáně a tvorbu zánětu. Pentan by tak mohl být využit jako neinvazivní faktor aktivity zánětu. Jeho správným stanovením v dechu pomocí SIFT-MS bychom získaly užitečný nástroj pro monitoring pacientů s IBD.

Cílem práce je vyvinout metodu pro stanovení koncentrace pentanu v lidském dechu. Předpokladem pro toto stanovení je znalost hodnoty rychlostní konstanty reakce pentanu s jedním z prekurzorů, konkrétně s O_2^{+} . Tuto hodnotu je nejprve nutné experimentálně změřit a porovnat s hodnotami konstant ze starších studií, které si neodpovídají. Samotné měření pentanu v lidském dechu musí probíhat u všech jedinců stejným způsobem. Proto je dalším úkolem práce vytvoření protokolu měření pentanu v lidském dechu a také stanovení jeho běžné koncentrace v dechu zdravých jedinců.

2 Teoretická část

2.1 Hmotnostní spektrometrie v proudové trubici s vybranými ionty- SIFT-MS

Technika proudové trubice s vybranými ionty (SIFT) byla vyvinutá již v roce 1976 a to pro výzkum reakcí neutrálních molekul a iontů v plynné fázi [1]. Přispěla k pochopení reakcí probíhajících v zemské atmosféře a v mezihvězdných mračnecích a poskytla velké množství kinetických dat. Díky mnoha studiím vznikla rozsáhlá databáze rychlostních konstant k a produktů iontových reakcí. Tato databáze je dnes základem pro použití SIFT-MS k analytickým účelům, zejména ke stanovení stopových koncentrací plynů ve vzduchu se zaměřením na kvantitativní analýzu plynů v lidském dechu [2,3].

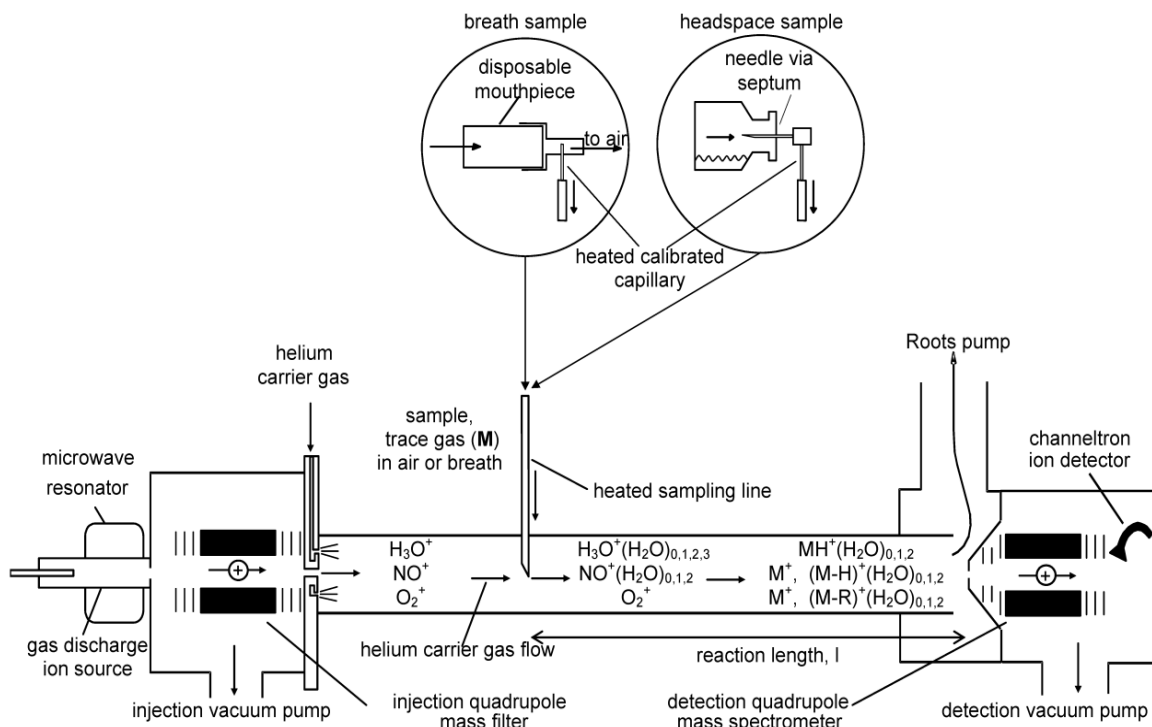
2.1.1. Princip SIFT-MS

V iontovém zdroji přístroje jsou vytvářeny kladně nabitě ionty ze směsi laboratorního vzduchu a vodní páry. Podle poměru hmotnosti k náboji je za použití kvadrupólového hmotnostního filtru vybrán jeden druh iontu, tzv. prekurzor. Tento prekurzor je vháněn do rychle proudícího inertního nosného plynu, jímž je nejčastěji čisté helium o tlaku přibližně 100 Pa. Malá část vzorku vzduchu, vydechovaného dechu, nebo *headspace* kapaliny je vyhřívanou kapilárou nasávána do trubice s nosným plynem a prekurzorovými ionty, kde dochází k chemické ionizaci původně neutrálních molekul analytu. Při této ionizaci vznikají ionty charakteristické pro daný analyt ve vzorku, které následně prochází dalším kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem a jsou detekovány pomocí násobiče. Výsledné hmotnostní spektrum je zaznamenáno počítačem. Princip metody je znázorněn na obrázku 1.

Absolutní koncentraci plynu lze určit v reálném čase ze známé rychlostní konstanty a poměru signálů iontových produktů a prekurzoru. Pomocí metody SIFT je možné rychlostní konstantu získat experimentálně a pro danou reakci spočítat. Během řady studií byly vypočítány rychlostní konstanty reakcí prekurzorů používaných v SIFT s mnoha organickými látkami [4].

Podmínkou pro prekurzorové ionty je jejich velmi nízká reaktivita s hlavními složkami vzduchu - dusíkem, kyslíkem, oxidem uhličitým a argonem. Zároveň musí prekurzory rychle reagovat s plyny přítomnými ve vzorku o stopových koncentracích. Jako vhodné ionty splňující tyto požadavky byly vybrány a jsou v SIFT-MS používány pouze ionty H_3O^+ , NO^+ a $\text{O}_2^{+\bullet}$.

Pro lepší pochopení principu metody si lze uvést příklad analýzy acetonu, organické látky, která je běžně přítomná v dechu každého z nás a reaguje se všemi výše uvedenými prekurzory. Při reakci s iontem H_3O^+ dochází k přenosu protonu na molekulu acetonu za vzniku $\text{CH}_3\text{COCH}_3\cdot\text{H}^+$, jehož m/z je 59. Reakcí s NO^+ vzniká $\text{CH}_3\text{COCH}_3\cdot\text{NO}^+$ s m/z 88. S $\text{O}_2^{+\bullet}$ dochází k parciální disociaci a vznikají ionty $\text{CH}_3\text{COCH}_3^{+\bullet}$ a CH_3CO^+ o m/z 58 a 43. Hodnoty m/z se objeví v hmotnostním spektru a slouží k identifikaci acetonu. Pokud se aceton nachází v izobarické směsi (například s propanalem), samotný ion H_3O^+ není dostačující, neboť dochází pouze k přenosu protonu a výsledná m/z jsou stejná. Proto se používá kombinace s iontem NO^+ , s kterým každá z látek reaguje jinak [5].



Obrázek 1. Princip hmotnostního spektrometru v proudové trubici s vybranými ionty - přístroje SIFT-MS. V trubici jsou znázorněny prekurzorové ionty s jejich hydratovanými formami a příklady vzniklých iontových produktů.

2.1.2 Reakce jednotlivých prekurzorů

Reakce s H_3O^+

Při reakci organických látek s H_3O^+ dochází ve velké většině případů k přenosu protonu z molekuly donoru (H_3O^+) na molekulu akceptoru (organická látka). Výhodou je, že při reakci obvykle vzniká pouze jeden nebo dva produkty, což umožňuje snadnější identifikaci látek ve směsi. Aby reakce proběhla účinně, musí být protonová afinita akceptoru vyšší než protonová afinita donoru. Protonová afinita většiny organických molekul je vyšší než iontu H_3O^+ , proto je vhodným prekurzorem pro analýzu v SIFT-MS. Reaguje-li H_3O^+ s látkou M, nejčastěji vzniká jediný stabilní produkt MH^+ . Pokud je látkou M alkohol (mimo metanol a etanol), aldehyd nebo karboxylová kyselina dochází v některých případech po přenosu protonu k eliminaci molekuly vody ze vzniklého iontu, a to díky dostupné OH skupině v těchto látkách. Pokud je analytem polární látka, dochází k tvorbě hydratovaných iontů tzv. „clusterů“ a v hmotnostním spektru vidíme dva i více píků jednoho analytu lišících se o relativní molekulovou hmotnost vody 18. Při kvantitativní analýze musíme započítat i četnosti těchto jednotlivých hydratovaných iontů ve spektru.

Reakce s NO^+

Reakce organických látek s prekurzorem NO^+ jsou různorodější, než v případě iontu H_3O^+ , ale produktem obvykle bývají jeden nebo dva ionty. Pokud je ionizační energie látky M nižší než ionizační energie NO^+ (9,26eV), dochází k pouhému přenosu náboje a vzniku radikálu M^{\bullet} . Při reakci s aldehydy a ethery dochází k odštěpení vodíkového iontu z organické látky a zároveň ke vzniku HNO . K tomu dochází běžně i u primárních a sekundárních alkoholů, přičemž u terciárních alkoholů dochází k přenosu celé OH skupiny a vzniká HNO_2 . U některých karboxylových kyselin, esterů a ketonů dochází k prosté asociaci s iontem NO^+ za vzniku NO^+M . Tato reakce je trimolekulární a je stabilizována atomy helia. Vznik NO^+M iontů převládá, když se ionizační energie látky M blíží ionizační energii prekurzoru NO^+ (např. u acetonu 9,71eV). Výsledné produkty reakcí NO^+ s M také někdy podléhají hydrataci, což je třeba zahrnout pro dosažení přesného stanovení analytu ve vzorku.

Reakce s $O_2^{+\bullet}$

Vzhledem k tomu, že ionizační energie $O_2^{+\bullet}$ (12.06eV) je větší než IE většiny organických látek, dochází většinou k přenosu náboje za vzniku $M^{+\bullet}$ za současného rozkladu látky M a vzniku jejích fragmentů. Ionizace prekurzorem $O_2^{+\bullet}$ způsobuje rozpad organických sloučenin a vznik dvou i více iontů, což dělá výsledné spektrum komplikovanější. Tato ionizace je velice podobná elektronové ionizaci a výsledná spektra lze porovnávat s dostupnými databázemi, jako je např. databáze NIST (National Institute of Standards and Technology).

Prekurzor $O_2^{+\bullet}$ je proto vhodnější zejména pro identifikaci a kvantifikaci malých anorganických molekul jako NO, NO₂, CS₂, které nereagují s H₃O⁺ ani NO⁺. Jejich ionizací dochází pouze k přenosu náboje a vzniku jediného produktu. Prekurzor $O_2^{+\bullet}$ na rozdíl od předchozích prekurzorů reaguje s molekulami vody pomalu a nedochází k významnější tvorbě hydratovaných iontů [6].

2.1.3. Výpočet absolutní koncentrace

Absolutní koncentraci stopových molekul plynu lze stanovit v reálném čase, a to díky znalosti rychlostních konstant pro probíhající reakci. Princip kvantifikace lze nastínit například na reakci prekurzorového iontu H₃O⁺ s molekulou vzorku M. Reakci můžeme znázornit rovnicí:



Reakce probíhá podle přesně definovaného reakčního času t_r , s rychlostní konstantou k a platí:

$$(2) \quad [MH^+] = k[M][H_3O^+]t_r$$

Z rovnice lze vyjádřit vztah pro koncentraci molekuly M:

$$(3) \quad [M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{[MH^+]}{k[H_3O^+]}$$

Ve skutečnosti je výsledná rovnice, kterou software SIFT-MS využívá pro absolutní kvantifikaci analytu v reálném čase, složitější (4). Do výpočtu jsou započítávány fyzikální parametry přístroje a rovněž difúzní koeficienty související s velikostí analyzovaných molekul. Výše uvedený příklad vycházející z kinetiky 1. řádu je ovšem zcela správný a dostatečně demonstruje princip výpočtu absolutní koncentrace.

$$(4) \quad [M] = \frac{1}{t_r} \cdot \frac{I_{p1}/D_{ep1} + I_{p2}/D_{ep2} + \dots}{I_{i1}k + I_{i2}[(k_1 + k_2)/2] / D_{ei2}}$$

Kde I_{p1} , I_{p2} jsou signály iontů jednotlivých produktů, I_{i1} , I_{i2} jsou signály prekurzorových iontů (např. H_3O^+ , $H_3O^+(H_2O)$,...), $k_{1,2}$ jsou rychlostní konstanty reakcí, které probíhají mezi iontem prekurzoru a vzorkem [M]. D_{ep1} , D_{ep2} , D_{ei2} jsou koeficienty produktů a iontových prekurzorů popisujících diferenciální difúzi [7].

2.1.4. Využití SIFT-MS

Výhodou přístroje SIFT-MS je možnost postupného použití více prekurzorů, což znamená poměrně širokou škálu látek, které mohou být přístrojem analyzovány a to v reálném čase. Přepínání mezi jednotlivými prekurzory probíhá softwarově v řádu milisekund. Vzorkem může být okolní ovzduší, vydechovaný vzduch nebo *headspace* kapaliny například moči nebo kultury bakterií. Přístroj má tedy široké rozpětí využití v rozmanitých oblastech výzkumu v klinické diagnostice, zemědělství, životním prostředí nebo medicíně. V rámci životního prostředí bylo analyzováno např. znečištění vzduchu ve městě, výfukové plyny z automobilů, kouř z cigaret, nebo vzduch v laboratořích či továrnách v souvislosti s bezpečností pracovního prostředí. Velký potenciál má přístroj v analýze lidského dechu za účelem klinické diagnostiky a terapeutického monitoringu [8,9,10].

2.2 Analýza dechu

Analýza dechu je založená na identifikaci a kvantifikaci těkavých látek v lidském dechu. Ten obsahuje mnoho stopových látek, jež jsou produktem metabolismu člověka, a jejich koncentrace může být ovlivněna v důsledku určitého onemocnění. Mezi běžné metabolity nacházející se v dechu patří například amoniak, oxid dusnatý, oxid uhelnatý, etanol, metanol, acetaldehyd, isopren a další vyšší alkoholy, aldehydy, ketony či jiné organické sloučeniny. Ne všechny v dechu přítomné metabolity byly doposud identifikovány a pouze u malé části bylo zkoumáno rozmezí jejich fyziologické koncentrace v lidském dechu. Znalost fyziologické koncentrace těchto metabolitů v dechu zdravých jedinců je nutná pro rozpoznání koncentrace patologické.

Velkou výhodou analýzy dechu je snadný a rychlý odběr vzorku, který úzce odráží koncentraci analytu v krvi. Dnes je základem pro stanovení klinické diagnózy běžná analýza krve (popř. moči), u některých onemocnění je nutná biopsie, či endoskopická vyšetření. To vyžaduje relativně invazivní odebrání vzorku, které může být nepohodlné pro pacienta, zejména, pokud je jím malé dítě. Analýza dechu je oproti tomu zcela neinvazivní, bezbolestná a může být jednoduše použita u všech pacientů. Při použití přístroje SIFT-MS jsou výsledky získány v reálném čase a okamžitě dostupné pro lékaře. Na druhou stranu musí být brán zřetel na to, že složení dechu člověka není konstantní a je poměrně lehce ovlivnitelné. Významný vliv na jednotlivé složky dechu mohou mít faktory jako věk, pohlaví, fyzická zátěž, skladba jídla, delší hladovění nebo speciální dieta. Samozřejmě se v dechu projeví i požití alkoholu, kouření popřípadě vystavení se jiným exogenním látkám v životním prostředí [11,12].

Potenciál analýzy dechu leží hlavně v oblastech klinické diagnostiky, terapeutického monitoringu nebo studia metabolismu jednotlivých látek. Některé metabolity jsou zkoumány například jako biomarkery plicních onemocnění jako je astma, cystická fibróza nebo chronická obstrukční choroba plic [13]. Zvýšená koncentrace acetonu v dechu je studována v souvislosti s onemocněním diabetes mellitus. Hladina amoniaku je sledována u pacientů s poškozením ledvin k možnému posouzení účinnosti procesu dialýzy [14]. Změny koncentrace některých stopových látek v dechu mohou být také spjaty s přítomností rakoviny. Sledovaný analyt ovšem nemusí být vytvářen pouze lidským metabolismem. I mikroorganismy jsou

producentem těkavých organických sloučenin, které mohou být následně v dechu detekovány a posloužit jako biomarker při infekcích plic [15].

2.3. Pentan v dechu jako biomarker zánětlivých střevních onemocnění

Zánětlivá střevní onemocnění (IBD – inflammatory bowel disease) jsou skupinou chronických poruch trávicího ústrojí způsobující rozsáhlé záněty a poškození střev a konečníku. Samotná příčina onemocnění nebyla doposud objasněna, ale vše nasvědčuje tomu, že se jedná o autoimunitní onemocnění, kdy významnou roli hrají genetické predispozice, okolní prostředí a životní styl [16].

Jednou z příčin zánětu mohou být volné radikály, a to zejména reaktivní formy kyslíku (ROS - Reactive Oxygen Species), které jsou za normálních podmínek nezbytné pro správné fungování organismu. Tyto vysoce reaktivní molekuly napadají polynenasycené mastné kyseliny obsažené ve fosfolipidech, které jsou hlavní součástí buněčných membrán. Tím dochází k jejich modifikaci a k tzv. peroxidaci lipidů, kdy jako vedlejší produkty jsou uvolňovány některé alkany. Působením určitého patologického faktoru dochází k zvýšení hladiny těchto volných radikálů a tím i k nadměrné peroxidaci lipidů, což vede k porušení membránové struktury a k poškození tkáně. Tento proces tudíž provází, nebo je příčinou řady onemocnění [17].

Při zvýšené peroxidaci lipidů zákonitě dochází i ke zvýšené tvorbě alkanů jako vedlejších produktů probíhajících reakcí. Měření vydechovaných uhlovodíků by tak mohlo u pacientů s IBD sloužit jako indikátor výskytu zánětu. Zatím bylo provedeno pouze pár studií, které měřily koncentrace konkrétně pentanu a etanu (uhlovodíky vznikající konkrétně při peroxidaci ω -6 a ω -3 mastných kyselin) v dechu nemocných pacientů.

První studie na toto téma vůbec [18] měřila koncentrace pentanu v dechu pomocí plynové chromatografie a to u pacientů s Crohnovou chorobou, CD nebo ulcerativní kolitidou, UC (nejčastější typy IBD). Zároveň bylo u pacientů prováděno měření indiem značených leukocytů ke zjištění přítomnosti aktivní formy onemocnění. U pacientů s negativním nálezem (= žádný abnormální výskyt zánětu) byla naměřena průměrná koncentrace pentanu 2,1 nmol/L (46 ppb). Průměrná koncentrace pacientů

s pozitivním nálezem byla změřena na 4,3 nmol/L (95 ppb). Výsledkem studie byla jasná souvislost mezi hladinou pentanu v dechu a aktivitou IBD.

Ve studii provedené o rok později [19] byly opět plynovou chromatografií měřeny koncentrace pentanu a etanu, a to u pacientů s aktivní formou UC. Pacientům byly odebrány vzorky rektální bioskopií, které byly (mimo standardního vyšetření sliznice) použity i k odhadu míry ROS ve tkáni pomocí chemiluminiscence. Endoskopická vyšetření společně s dalšími faktory a chemiluminiscencí tkáně byly jako míra onemocnění porovnávány s koncentracemi etanu a pentanu v dechu. Průměrné naměřené hodnoty koncentrace etanu v dechu pacientů se téměř nelišily od hodnot kontrolní skupiny - 0,45 nmol/L (10 ppb) oproti 0,33 nmol/L (7 ppb), ale byla zjištěna korelace koncentrace etanu v dechu s mírou aktivity onemocnění. Průměrná naměřená koncentrace pentanu v dechu pacientů - 3,43 nmol/L (75 ppb) se pouze mírně lišila od kontrol zdravých jedinců - 3,01 nmol/L (66 ppb), přičemž nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi skupinami pacientů s vážnějšími a lehčími symptomy onemocnění (na rozdíl od etanu, kde s vážnějšími symptomy, rostla i jeho koncentrace v dechu.)

Nejnovější studie provedená pět let poté [20] měřila koncentrace skupiny uhlovodíků (etanu, pentanu, propanu, butanu a izoprenu) v dechu pacientů s IBD s tím, že byl kladen důraz na důkladné rozdělení pentanu od izoprenu na chromatografické koloně. (Možné nedostatečné rozdělení pentanu od izoprenu na chromatografické koloně a tím pádem i jeho falešně zvýšené hodnoty byly vyčítány výše zmíněným předchozím studiím). Významné rozdíly mezi pacienty s IBD a kontrolami byly naměřeny u etanu, propanu a pentanu. Koncentrace butanu ani izoprenu se od kontrol výrazněji nelišily. Výsledkem studie bylo potvrzení, že hladina pentanu u pacientů s IBD je skutečně zvýšená a nejedná se o chybu způsobenou společnou elucí pentanu s izoprenem, popřípadě jejich záměnou. Také naměřené zvýšené koncentrace propanu značí, že i tento uhlovodík by mohl být markerem peroxidace lipidů.

Jako nejvhodnější marker se ale zatím zdá být pentan, který vzniká peroxidací zejména ω -6 mastných kyselin. Ty mají v organismu převahu, a tudíž je pentan produkován ve vyšších a snadněji stanovitelných koncentracích. Stanovení pentanu v dechu tak může být velmi cenným neinvazivním nástrojem pro studium a monitorování pacientů s IBD.

3 Experimentální část

3.1 Iontová chemie pentanu – stanovení rychlostní konstanty a iontových produktů

Absolutní koncentraci pentanu v lidském dechu je možné stanovit ze známé rychlostní konstanty a ze znalosti iontových produktů, které vznikají reakcemi molekuly pentanu s ionty prekurzoru. Iontová chemie pentanu byla již v minulosti studována [21,22]. Byly stanoveny iontové produkty s jejich procentuálním zastoupením a rychlostní konstanta reakce pentanu s O_2^{+} prekurzorem. V prvně uvedené studii byla rychlostní konstanta reakce vypočítána teoreticky, v druhé pak změřena experimentálně. Hodnoty rychlostních konstant z obou studií si ovšem neodpovídají. Proto bylo nutné experiment zopakovat a zjistit skutečnou rychlostní konstantu reakce. Dalším důvodem bylo také použití novějšího typu přístroje SIFT-MS (SIFT-MS Profile 3, Instrument Science Limited, Crewe, UK viz Obr. 2)

Reakci pentanu s prekurzorem O_2^{+} lze popsat z hlediska kinetiky prvního řádu, kdy koncentrace pentanu přiváděného do přístroje je mnohem větší než koncentrace iontů a tím pádem jeho koncentrace zůstává prakticky konstantní. S rostoucí koncentrací pentanu přiváděného do proudové trubice exponenciálně klesá koncentrace prekurzoru. Stanovení rychlostní konstanty je dáno změnou koncentrace prekurzoru O_2^{+} v závislosti na měnící se koncentraci pentanu ve vzorku. Různou koncentraci plynného pentanu ve vzorku lze simulovat pomocí průtokoměru, přes který vedeme vzorek do přístroje. Při utahování průtokoměru proudí do přístroje méně vzorku, tudíž narůstá koncentrace prekurzoru.

Do skleněné kyvety o objemu 2 L napuštěné suchým vzduchem bylo pomocí injekční stříkačky vstříknuto 100 mL *headspace* pentanu (Pentan Sigma Aldrich bezvodý $\geq 99\%$) o teplotě 21°C. Výsledná pěti procentní směs byla zaváděna do přístroje kapilárou přes průtokoměr. Jako prekurzor byl použit O_2^{+} . Na přístroji byl nastaven rozsah hmot od 10 do 100 m/z , což pokrývá oblast molekulových hmotností



Obrázek 2. Přístroj SIFT-MS Profile 3

produktů vzniklých reakcí s prekurzorem. Byla změřena tři hmotnostní spektra, která byla integrována po dobu šedesáti sekund. Na výsledných spektrech byly identifikovány hlavní iontové produkty. SIFT byl poté nastaven do MIM (multiple ion monitoring) módu ke sledování koncentrací těchto produktů (respektive počtu iontů za sekundu, který je přímo úměrný množství látky přiváděné do přístroje) v reálném čase. Průtok vzorku pentanu byl regulován pomocí průtokoměru a byly sledovány změny koncentrace prekurzoru. S přibývajícím množstvím vzorku proudícího do přístroje signál O_2^{+} prekurzoru postupně klesal, naopak při snižování průtoku pentanu do přístroje signál prekurzoru rostl. Ze závislosti signálu O_2^{+} na průtoku vzorku byla stanovena hodnota rychlostní konstanty pro reakci molekul pentanu s ionty O_2^{+} .

3.2 Měření koncentrace pentanu v lidském dechu

Nejprve byla změřena hmotnostní spektra dechu zdravého jedince a to pro každý prekurzor zvlášť. Jedinec vydechoval po dobu 20 sekund přímo do přístroje, který byl nastaven na měření hmot od 10 do 100 m/z . Tato oblast zahrnuje molekulové hmotnosti produktů vzniklých reakcemi jednotlivých prekurzorů s látkami běžně se vyskytujícími v lidském dechu. Celkem byla tedy získána tři hmotnostní spektra, která byla následně vyhodnocena a jednotlivé látky na něm identifikovány.

Pro pentan byly provedeny dvě série měření a to na skupině zdravých jedinců a na skupině pacientů trpících zánětlivými střevními onemocněními (IBD). První měření bylo prováděno na skupině 81 studentů ve věku 16-19 let při příležitosti dne otevřených dveří 3. - 4. 11. 2012 na Ústavu fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR. Měření celkem 48 pacientů s IBD (20 s Crohnovou chorobou a 28 ulcerózní kolitidou) probíhalo ve dnech 21. 11. – 2. 12. 2011 v klinickém centru ISCARE^{pozn}. Měření probíhala v MIM modu.

Postup měření dechu probíhal u všech stejným způsobem a jednotlivci byli vždy předem instruováni jakým způsobem do přístroje vydechat. Každý vydechoval přes jednorázový ústní náustek do přístroje pomalu, a to po dobu 20 sekund. Výdechy byly

^{pozn}. Každému pacientu byl přidělen identifikační kód obsahující pouze informace o typu onemocnění, aktivitě nemoci, věku a pohlaví. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Měření bylo schváleno etickou komisí klinického centra ISCARE.

prováděny u každého celkem třikrát a to pro každý prekurzor. Pro měření samotného pentanu by stačilo použít pouze prekurzor O_2^{++} , s kterým jediným pentan reaguje. Měření ovšem probíhalo v rámci větší studie zabývající se i jinými látkami obsaženými v dechu, proto byly použity i prekurzory H_3O^+ a NO^+ . Jedinci tedy vydechovali celkem devětkrát za sebou s dostatečnými přestávkami.

3.3 Měření koncentrace exogenního pentanu v lidském dechu

Zdroj pentanu v lidském dechu nemusí být jen původu endogenního, ale také exogenního, což znamená, že pentan v dechu může pocházet z vnějšího prostředí. Například při krátké manipulaci s těkavým roztokem pentanu v laboratoři můžeme v dechu laborantů zachytit jeho stopy, a to i s několikahodinovým odstupem. Dle agentury OSHA (Occupational Safety and Health Administration) je přípustný expoziční limit pro pentan (PEL – Permissible exposure limits) na pracovišti během osmihodinové pracovní směny 1000 ppm.

U dobrovolníků, kteří po dobu pěti minut omývali chemické nádoby roztokem pentanu, bylo zkoumáno, nakolik se pentan projeví v jejich dechu. Nejprve bylo změřeno celkové hmotnostní spektrum dechu obou dobrovolníků na rozsahu hmot od 10 do 100 m/z . Poté byla v MIM módu sledována závislost postupně klesající koncentrace pentanu v dechu na čase uplynulém od inhalace.

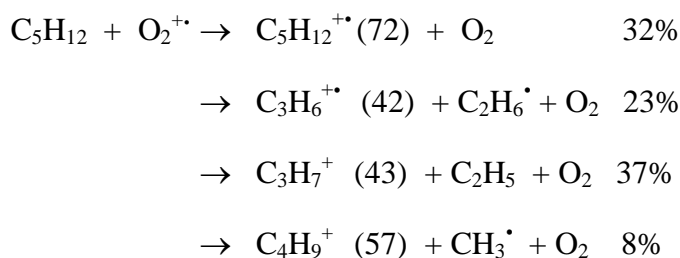


I. Ilustrační foto Průběh analýzy dechu

4 Výsledky

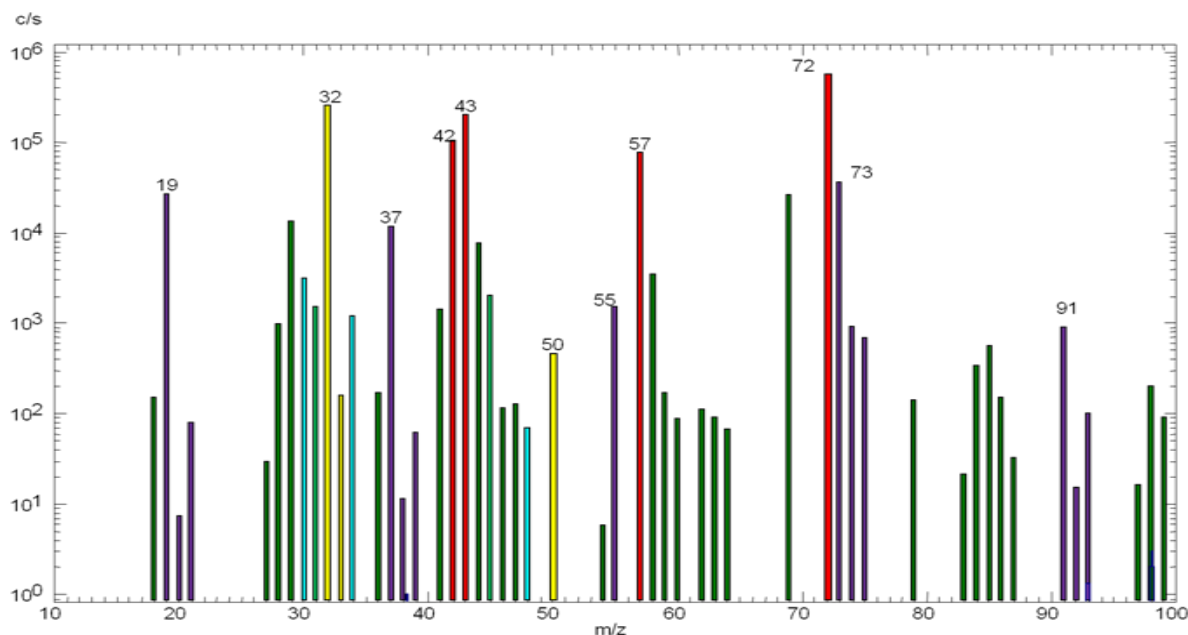
4.1 Iontová chemie pentanu – stanovení rychlostní konstanty a iontových produktů

Při reakci pentanu s prekurzorem $O_2^{+•}$ vznikají celkem čtyři charakteristické iontové produkty, které lze na hmotnostním spektru pentanu pozorovat jako píky 42, 43, 57 a 72. (Obr. 3). Ty odpovídají iontům $C_3H_6^{+•}$ (42), $C_3H_7^+$ (43), $C_4H_9^+$ (57) a $C_5H_{12}^{+•}$ (72). Tyto ionty vznikají níže uvedenými reakcemi, u kterých jsou zároveň uvedena procentuální zastoupení těchto iontových produktů pentanu (Obr. 4). K samotnému výpočtu koncentrace pentanu se ovšem používají pouze dva jeho iontové produkty a to ty o m/z 42 a 72. Je to z toho důvodu, že na píku 43 vytváří iontový produkt také aceton a k píku 57 přispívá 0,2 procentem izotop $H_3^{18}O^+$. Pokud bychom koncentraci pentanu měřily ze všech čtyř píků, dostávaly bychom falešně vyšší výsledky. Správnou koncentraci pentanu získáme vynásobením hodnoty (změřené ze dvou prekurzorů) koeficientem (f_p) odvozeným ze známého procentuálního zastoupení všech čtyř produktů pentanu. Tento koeficient se zadává přímo do kinetické knihovny softwaru přístroje SIFT-MS a ten přepočít provádí automaticky (Tab. 1).

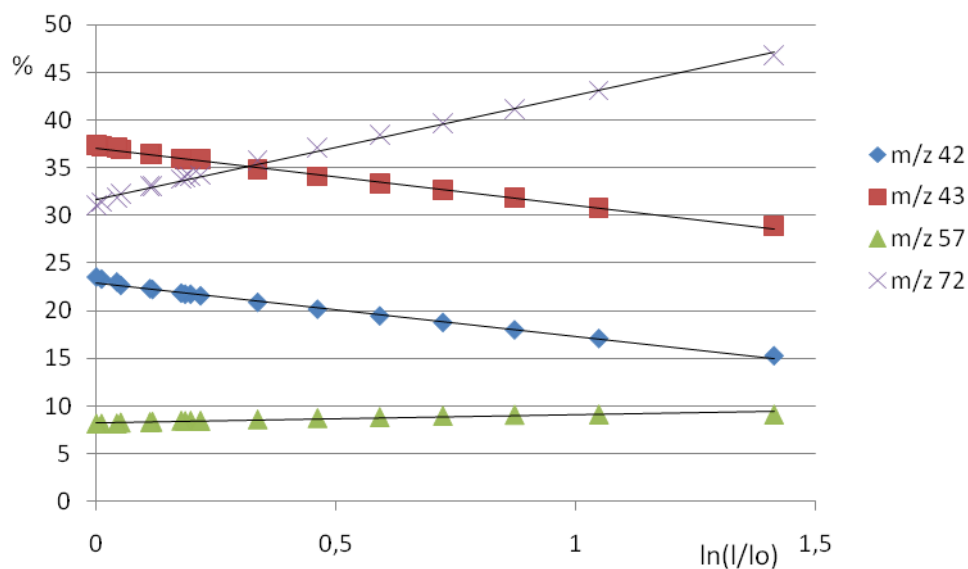


Tabulka 1. Kinetická knihovna ve formátu, který používá software SIFT-MS pro výpočet absolutní koncentrace. Koeficient (f_p) je vyznačen tučně. Hodnota uváděná za prekurzorem udává rychlostní konstantu reakce pentanu s prekurzorem $O_2^{+•}$.

Pentane ($O_2^{+•}$)
2 precursors
32 0.8E-09 1.0
55 0.8E-09 -5.0
2 products
42 1.82
72 1.82



Obrázek 3. Hmotnostní spektrum pentanu s prekurzorem O_2^{+} . Červeně označené píky o m/z 42,43,57 a 72 odpovídají jednotlivým iontovým produktům pentanu. Žluté píky o m/z 32 a 50 patří prekurzoru O_2^{+} . a jeho hydratované formě $O_2^{+} \cdot H_2O$. Hodnoty píků 19,37,55,91 odpovídají iontům H_3O^{+} a jeho vodním klastrům $H_3O^{+} \cdot (H_2O)_{1,2,3}$



Obrázek 4. Procentuální zastoupení jednotlivých iontových produktů vynesené do grafu jako funkce průtoku 5 % směsi pentanu v suchém vzduchu při reakci s O_2^{+} prekurzorem. Primární iontové produkty jsou získány extrapolací přímky do nulového průtoku. Rychlost průtoku vzorku je dána v relativních jednotkách, které odpovídají exponenciálnímu poklesu signálu O_2^{+} prekurzoru během jeho reakce s molekulami pentanu.

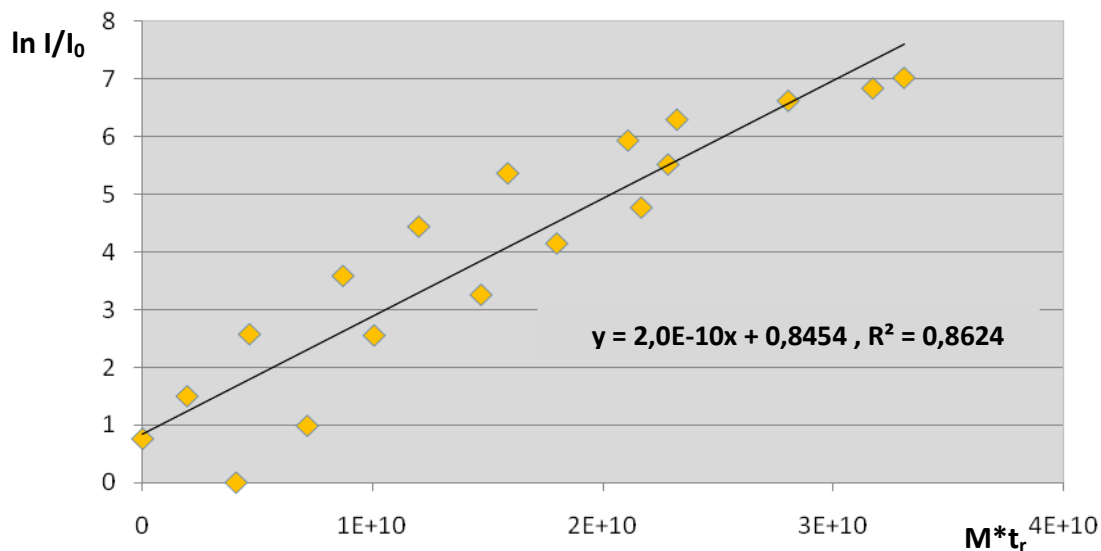
Rychlostní konstantu reakce pentanu s prekurzorem O_2^{+*} lze získat z rovnice prvního řádu:

$$\text{I. rovnice} \quad I = I_0 e^{-k[M]t_r}$$

kde I vyjadřuje počet iontů prekurzoru v přítomnosti reagujícího analytu M (pentanu), I_0 počet prekurzoru bez analytu, $[M]$ počet částic analytu v cm^3 , a t_r reakční čas neboli dobu, po kterou prekurzor reaguje s molekulami analytu ve vzorku. Rovnici si lze upravit na vhodnější tvar:

$$\text{II. rovnice} \quad \ln \frac{I_0}{I} = [M]t_r * k$$

Počty iontů byly odečteny z přístroje. Vztah pro $[M]$ byl odvozen ze stavové rovnice ideálního plynu (Tab. 2). Reakční čas t_r je pro daný přístroj konstantou a to při stálé rychlosti průtoku nosného plynu, kterou lze spočítat z rychlosti čerpání trubice a tlaku nosného plynu. Do grafu (Obr. 5) byla vynesena závislost $\ln I_0/I$ na $[M]t_r$. Rychlostní konstanta reakce pentanu s prekurzorem O_2^{+*} je směrnici vzniklého grafu a její hodnota je $2,0 \times 10^{-10}$.



Obrázek 5. Graf znázorňující závislost časové změny intenzity prekurzoru ($\ln I/I_0$) na koncentraci pentanu. Hodnota směrnice přímky odpovídá rychlostní konstantě viz II. rovnice

Tabulka 2. Odvození vztahu pro [M]. Výsledný vztah pro [M] (cm⁻³) je zvýrazněn tučně. Tento vztah je dán průtokem vzorku Φ_m , celkovým průtokem v trubici Φ_c (vypočteným z hodnoty na průtokoměru násobené koncentrací pentanu ve vzorku korigovaným na tenzi par při dané teplotě), celkovým tlakem v proudové trubici p_g (Torr), absolutní teplotou T_0 (273,15K) a teplotou nosného plynu T_g . Použité fyzikální konstanty Loschmidtovo číslo $N_0 = 2.687 \times 10^{19}$ (cm⁻³), standardní atmosférický tlak $p_0 = 760$ Torr a $V_0 = 1$ cm³ byly pro zjednodušení sloučeny do jednoho koeficientu b .

$$\begin{aligned}
 pV &= nRT & pV &= \frac{N}{N_A} RT & p_0 V_0 &= \frac{N_0}{N_A} RT_0 \\
 [M] &= \frac{N}{V} & \frac{p_g V}{p_0 V_0} &= \frac{\frac{N}{N_A} RT}{\frac{N_0}{N_A} RT_0} \rightarrow \frac{N}{V} &= \frac{N_0}{p_0 V_0} p_g \frac{T_0}{T_g} \\
 b &= \frac{N_0}{p_0 V_0} * 10^{-6} = 3,54 * 10^{16} \text{ Torr}^{-1} \text{ cm}^{-3} \\
 [M] &= 3,54 \cdot 10^{16} \cdot p_g \frac{T_0}{T_g} \frac{\Phi_m}{\Phi_c}
 \end{aligned}$$

Jak je zmíněno výše, rychlostní konstanta reakce pentanu s prekurzorem O_2^{+} byla již v minulosti jednou změřena [16]. Námi změřená rychlostní konstanta je ovšem 2,5x vyšší než hodnota konstanty ze zmíněné studie, a při jejím použití ve výpočtu koncentrace pentanu by vycházely koncentrace mnohem vyšší než očekávané. Vzhledem k tomu, že neexistuje jiná studie, s kterou bychom mohli konstanty porovnat, bylo nutné provést podobný experiment a tím ověřit, která z hodnot je správná.

Opět byla připravena směs pentanu s tím rozdílem, že se vycházelo z kapalného pentanu místo jeho *headspace*. Pentan byl před odebráním vzorku uchovávan v lednici, aby bylo dosaženo nižší tenze páry. Bylo nasáto 200 μ L pentanu a toto množství injektováno do skleněné vzorkovnice o objemu 2 L, která byla předem proplachována suchým vzduchem. Z této směsi byly odebrány 2 mL *headspace* do druhé vzorkovnice o stejném objemu. Tímto bylo dosaženo přesné koncentrace pentanu (výpočet viz Tab. 3). Koncentrace ve druhé vzorkovnici byla měřena stejným způsobem jako v předchozím případě ovšem bez použití průtokoměru (viz experimentální část). Do knihovny přístroje SIFT byly zadány obě rychlostní konstanty, čímž byly získány dvě různé hodnoty koncentrace pentanu (odpovídající jednotlivým konstantám). Ty byly

následně porovnány s předem vypočtenou koncentrací pentanu ve druhé vzorkovnici. Správná koncentrace pentanu odpovídala rychlostní konstantě z původní studie.

Tabulka 3. Výpočet koncentrace pentanu v druhé vzorkovnici. První rovnice znázorňuje objem plynného pentanu, který se odpařil v první vzorkovnici. C_1 vyjadřuje koncentraci pentanu v ppm v první vzorkovnici. C_2 udává výslednou měřenou koncentraci pentanu ve druhé vzorkovnici (bylo ředěno tisíckrát). Výsledná koncentrace je zvýrazněna tučně.

1.	$V_p = \frac{\rho * V}{M} * V_m = \frac{626 * 200 * 10^{-6}}{72,15} * 22,4 = 0,039 \text{ dm}^3$
2.	$c_1 = \frac{0,039}{2} * 100 = 1,9 \% \rightarrow 19500 \text{ ppm}$
3.	$c_2 = \frac{19500}{1000} = \mathbf{19,5 \text{ ppm}}$

Tímto experimentem byla tedy potvrzena rychlostní konstanta pro reakci pentanu s prekurzorem O_2^{+*} ($0,8 \times 10^{-9} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$) změřená v roce 1996. Postup našeho původního měření nebyl chybný, nicméně bylo odhaleno několik nedostatků, které mohly být příčinou nesprávného výsledku. Předně námi používaný průtokoměr byl kalibrován na vzduch, takže hodnoty na displeji přístroje při průtoku pětiprocentní směsi pentanu nemusely korelovat se skutečným průtokem procházející směsi. Výsledný graf ani konstanta by tak neodpovídaly skutečnosti. Ve výše citované studii byl využit pro přepočet průtoku vzduchu na průtok pentanu faktor určený pro daný typ průtokoměru. Tato informace k námi používanému průtokoměru není k dispozici. Chyba mohla vzniknout také v samotném začátku přípravy pětiprocentní směsi, kdy mohl být společně s parami pentanu nasán i vzduch, což by vedlo k nižší než požadované pětiprocentní koncentraci pentanu a samozřejmě by to opět negativně ovlivnilo výsledek. Důležitým bodem je zmínit, že koncentrace pentanu byla korigována na tenzi par při dané teplotě, takže zde k chybě nedošlo.

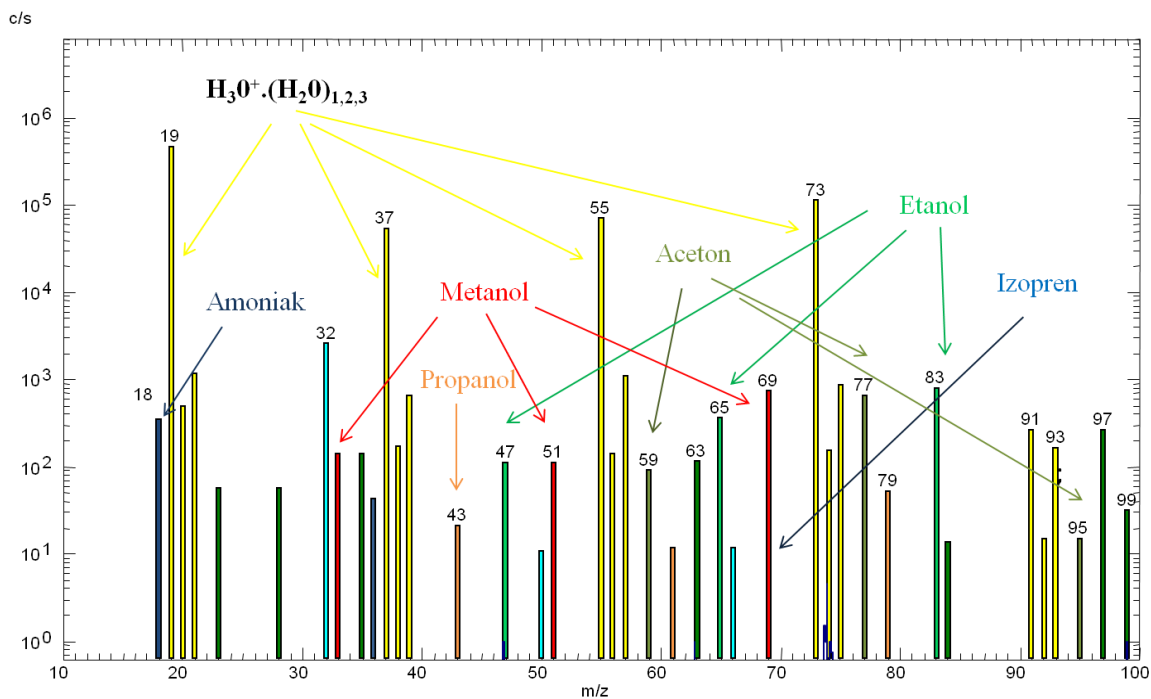
4.2. Měření koncentrace pentanu v lidském dechu

4.2.1. Hmotnostní spektra dechu zdravého jedince

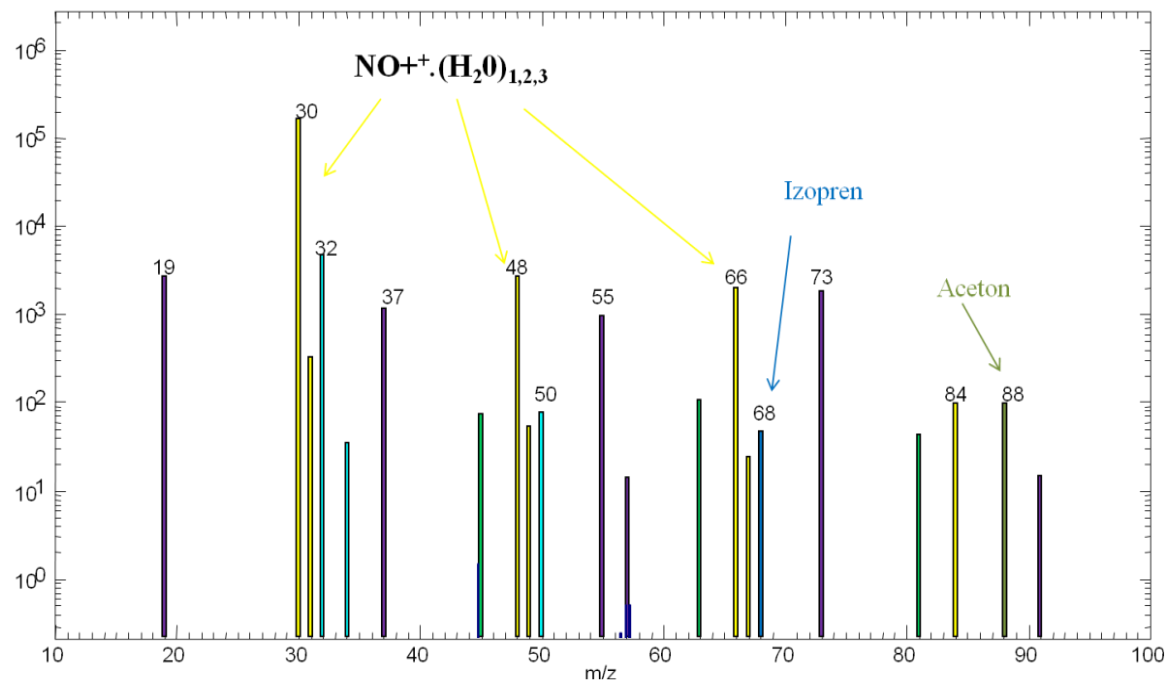
Spektrum dechu zdravého jedince s prekurzorem H_3O^+ je zobrazeno na obrázku (Obr 6a). Píky o největších intenzitách 19, 37, 55 a 72 odpovídají samotnému prekurzoru H_3O^+ a jeho vodním klastrům $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_{1,2,3}$. Zbylé píky znázorňují iontové produkty vzniklé reakcemi látek obsažených v dechu s prekurzorem. Typický aceton je dán dvěma píky o hmotě 59 a 77 odpovídající $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{H}^+$ a jeho monohydrátu $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{H}^+\text{H}_2\text{O}$. Pík 18 je protonovaný amoniak NH_4^+ . Izopren je detekován jako $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{CHCH}_3^+$, který jako nepolární látka netvoří hydráty a na spektru je tak přítomný pouze jeden jeho pík o m/z 69. K píku izoprenu 69 částečně přispívá i dihydrát metanolu (33,51,69), proto v případě kvantifikace těchto dvou látek je třeba užít i jiného prekurzoru. Dalšími na spektru viditelnými látkami přítomnými v dechu jsou etanol $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_2^+$ o m/z 47 (s dvěma hydráty 65 a 83) a propanol C_3H_7^+ o m/z 43, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}_2^+$ o m/z 61 (s hydráty $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}_2^+(\text{H}_2\text{O})_{1,2}$ o m/z 79 a 97).

Obrázek 6b) ukazuje hmotnostní spektrum vzorku dechu s prekurzorem NO^+ . To je typické výraznějším píkem 68 pro izopren C_5H_8^+ a píkem 88 pro aceton $\text{CH}_3\text{COCH}_3\text{NO}^+$. Nejvyšší píky 30, 48 a 66 tvoří prekurzor. Na spektru lze pozorovat také píky iontů vody pramenící z vlhkosti dechu a ion O_2^{++} (32, 50) vznikající s kyslíkem, který je jako nečistota součástí nosného plynu hélia.

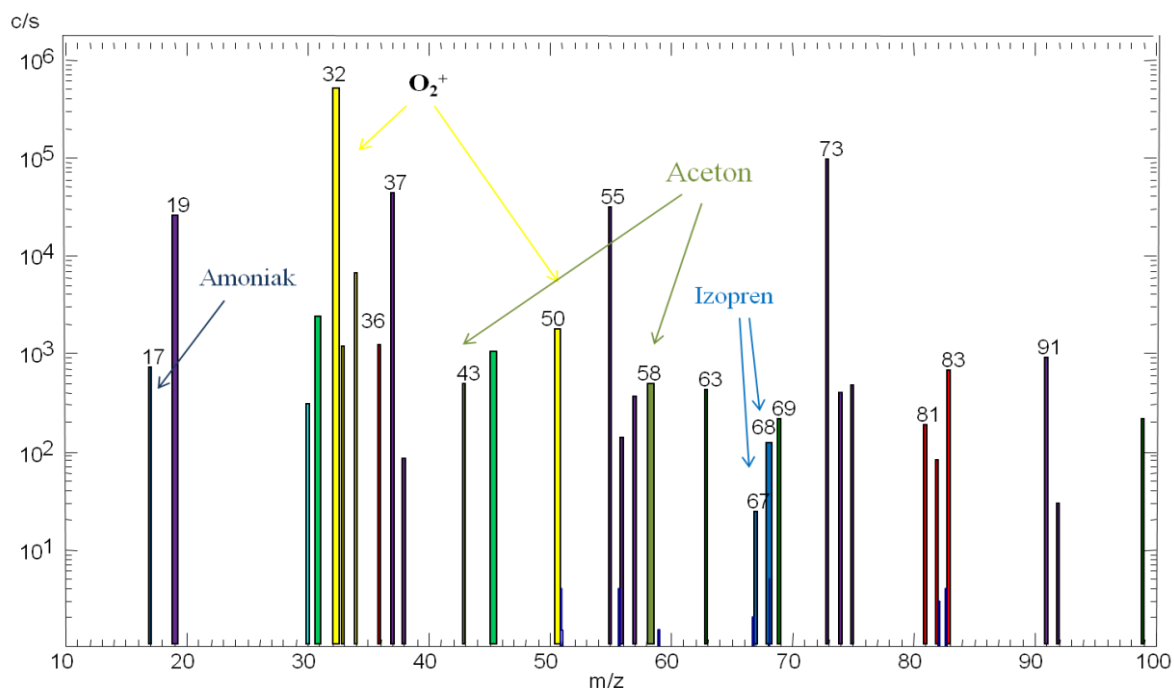
Spektrum s prekurzorem O_2^{++} bývá komplikovanější, neboť jeho ionizační energie je větší než většiny organických látek, což při vzájemné reakci vede k jejich rozkladu na dva a více fragmenty a těžší identifikaci. Na spektru na obrázku 6c) odpovídají nejvýraznější píky produktům acetonu o m/z 43 a 58 (CH_3CO^+ a $\text{CH}_3\text{COCH}_3^+$), izoprenu o m/z 67 a 68 (C_5H_7^+ a C_5H_8^+) a amoniaku o m/z 17 (NH_3^+).



Obrázek 6. a) Hmotnostní spektrum (počet iontů za sekundu proti m/z) dechu zdravého jedince získané při použití prekursoru H_3O^+ . Ionty prekursoru a jeho izotopů jsou vyznačeny žlutě vybarvenými píky. Hlavní stopové sloučeniny obsažené v dechu jsou rozpoznány dle jejich charakteristických iontových produktů a označeny barevně.



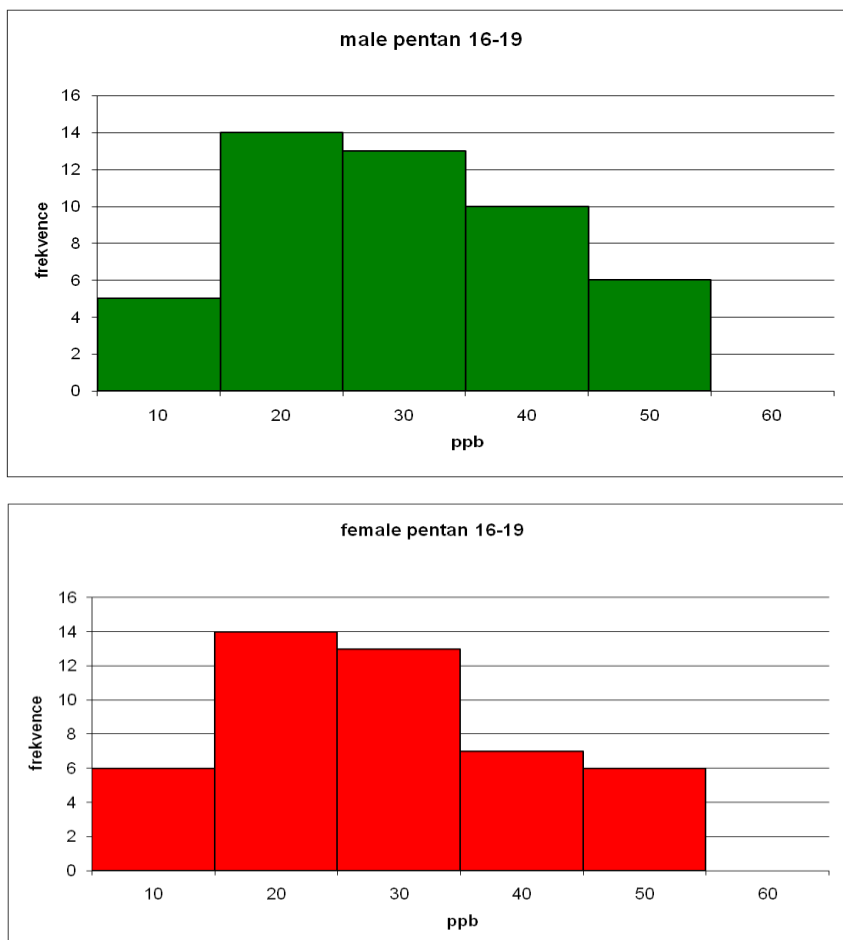
Obrázek 6. b) Hmotnostní spektrum dechu zdravého jedince získané při použití prekursoru NO^+



Obrázek 6. c) Hmotnostní spektrum dechu zdravého jedince získané při použití prekurzoru O₂⁺

4.2.2. Měření koncentrace pentanu v dechu dobrovolníků

Hodnota koncentrace pentanu v dechu každého dobrovolníka byla získána jako průměr koncentrací pentanu ze tří samostatných výdechů. Získaná data celkem 81 dobrovolníků ve věku od 16 do 19 let byla rozdělena na dvě skupiny dle pohlaví a vyhodnocena nezávisle na sobě. Statistické rozdělení koncentrace pentanu v dechu dobrovolníků je znázorněna histogramy na obrázku 7. Lze pozorovat, že tvar statistického rozdělení neodpovídá Gaussově křivce. Průměrná koncentrace pentanu v dechu mužů je 24 ppb a celkový rozsah koncentrací je od 4 do 49 ppb (medián hodnot koncentrace je 23 ppb). Průměrná koncentrace pentanu v dechu žen je 23 ppb a celkový rozsah koncentrací je od 0 do 49 ppb (medián 22 ppb). Statistické rozdíly mezi hladinami koncentrace pentanu v dechu u žen a mužů nejsou významné.



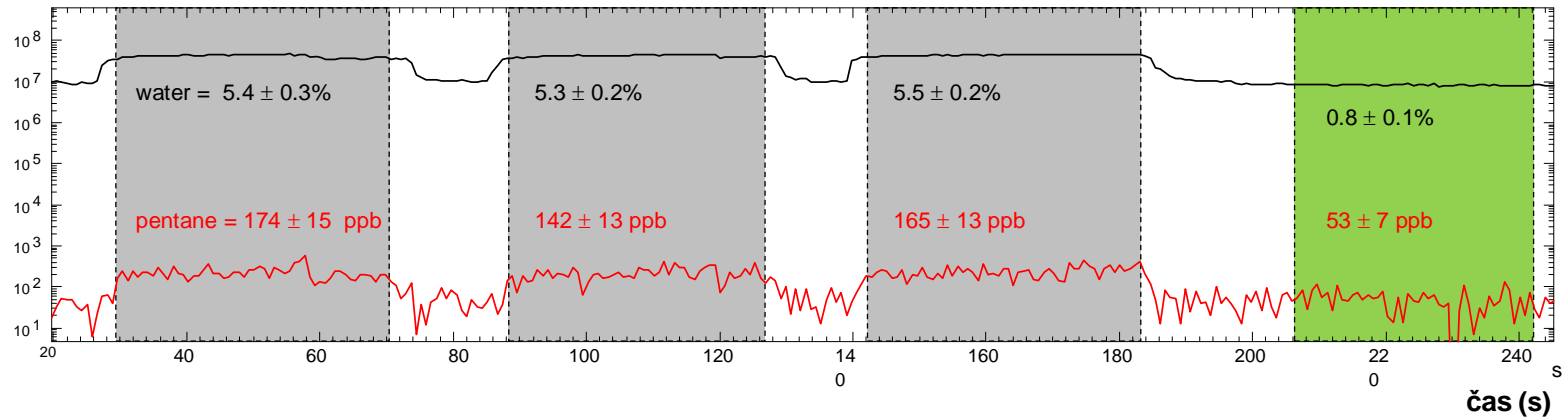
Obrázek 7. Histogramy znázorňující statistické rozdělení koncentrace pentanu v dechu u mužů a žen ve věku od 16-19 let.

4.2.3 Měření koncentrace pentanu v dechu pacientů s IBD

Studie probíhala celkem 14 dní, během kterých byl u 48 pacientů stanoven pentan v dechu. U 20 pacientů trpících Crohnovou chorobou byla naměřena průměrná hodnota koncentrace pentanu v dechu 59 ppb a rozsah hodnot koncentrací mezi 25-171 ppb. U 28 pacientů trpících ulcerativní kolitidou byl rozsah koncentrací 20 – 156 ppb a průměrná koncentrace 56 ppb. Při porovnání průměrných hodnot koncentrace pentanu v dechu pacientů trpících IBD s hodnotami zdravých jedinců, lze pozorovat více než dvojnásobné zvýšení těchto hodnot u pacientů. Tyto výsledky potvrzují, že pentan by mohl sloužit jako biomarker zánětlivých střevních onemocnění. Pro aplikaci do lékařské diagnostiky bude však nutné provést dlouhodobější a důkladnější studii. S projektem se tedy počítá i do budoucna.

c(ppb)

28-Nov-11 11:47:24 AM, O2+, IBD 25, UC 04 E



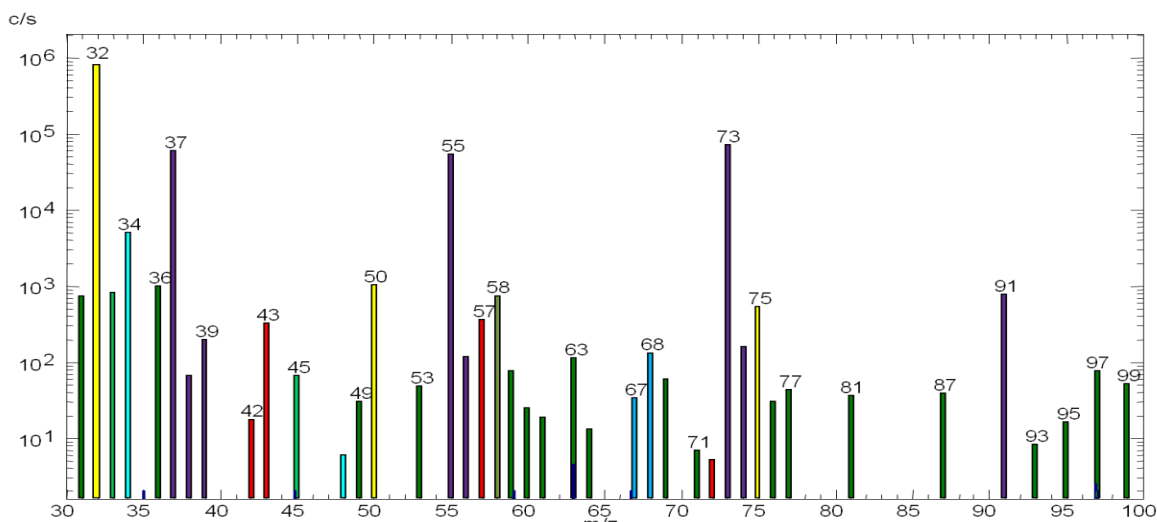
Obrázek 8. Hladina koncentrace pentanu ve výdeších jednoho z pacientů v MIM módu. Na ose x je čas v sekundách a na ose y koncentrace v ppb. Místa výdechů jsou vyznačena šedou barvou. Mezi jednotlivými výdechy je laboratorní vzduch. Byla změřena i koncentrace pentanu v pozadí, což je vyznačeno zelenou barvou. V dechu pacienta monitorujeme i vodní páru, která je důležitá pro kontrolu správného fungování přístroje, neboť její koncentrace v dechu člověka je standardně 5-6 %.

4.3. Měření koncentrace exogenního pentanu v lidském dechu

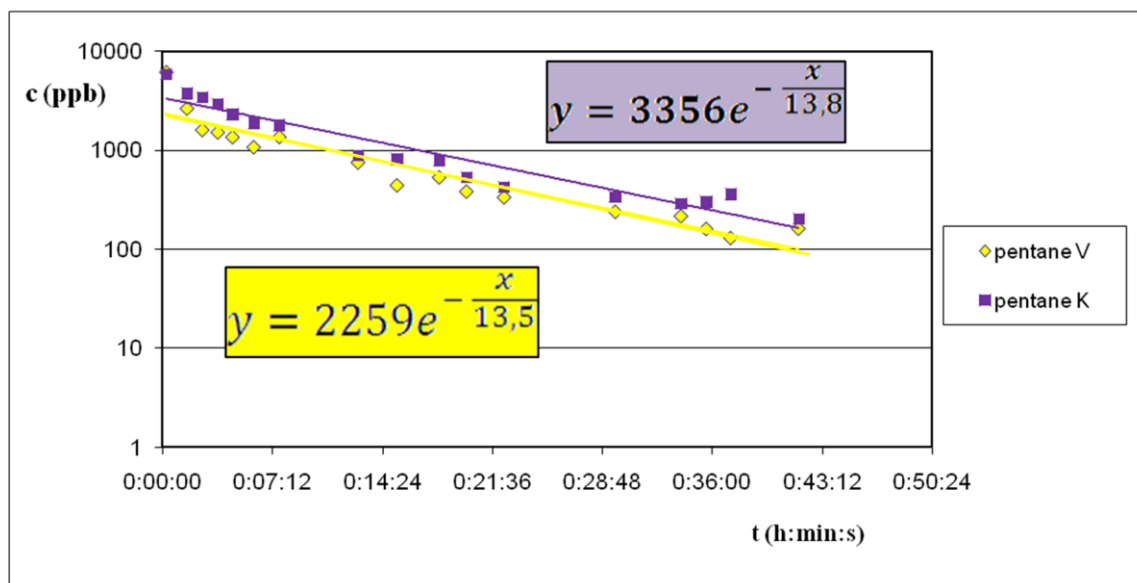
Jako první po inhalaci par pentanu bylo získáno celkové hmotnostní spektrum dechu jednoho z dobrovolníků (obrázek 9). To v porovnání se spektrem lidského dechu bez vlivu pentanu (obrázek 6c) obsahuje píky o m/z 42 a 72 odpovídající iontovým produktům pentanu. Na píkách o m/z 43 a 57 nevystupuje pouze pentan (viz. Experimentální část) proto nejsou pro důkaz pentanu v dechu jednoznačné. Nicméně dva píky jsou dostatečné k ověření přítomnosti pentanu v dechu bezprostředně po manipulaci s jeho roztokem a k získání představy o tom, jak spektrum dechu s exogenním pentanem vypadá.

Pro určení rychlosti odbourávání pentanu z dechu byla do grafu vynesena závislost koncentrace pentanu v dechu dvou dobrovolníků na čase. Body byly proloženy exponenciální křivkou a byla vyjádřena rovnice regrese, z které byl zjištěn rychlostní koeficient odbourávání exogenního pentanu z dechu (Obr. 10). Hodnoty u obou dobrovolníků jsou téměř totožné. Mírná odchylka bude způsobena pravděpodobně rozdílnou hmotností dobrovolníků.

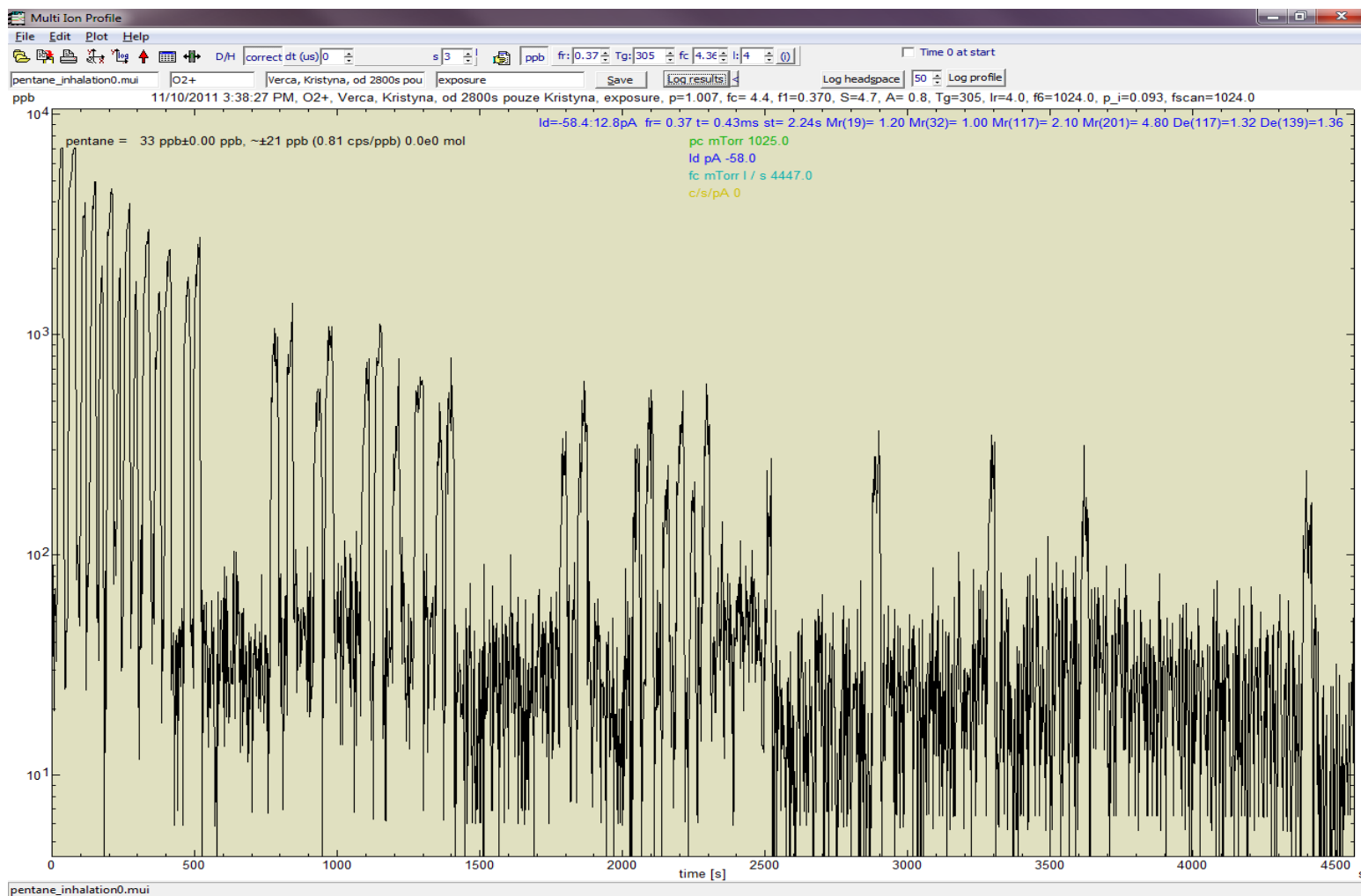
Postupně klesající koncentraci pentanu v dechu obou dobrovolníků můžeme vidět přímo na obrázku 11, kde je znázorněno rozhraní softwaru přístroje SIFT-MS při samotném měření koncentrace v MIM módu.



Obrázek 9. Hmotnostní spektrum dechu dobrovolníka po pětiminutové inhalaci par pentanu za použití prekurzoru O_2^+ . Červeně vyznačené píky odpovídají iontovým produktům pentanu. Pík 43 je navyšován přítomností iontového produktu acetonu CH_3CO^+ , který je přirozeně přítomen v dechu. Na píku 57 se podílí mimo pentanu také izotop H_3O^{18+} .



Obrázek 10. Závislost koncentrace pentanu v dechu dvou dobrovolníků (V, K) na čase. V barevných rámečcích jsou uvedeny rovnice regrese jednotlivých křivek se zjištěnými rychlostními konstantami odbourávání pentanu v minutách.



Obrázek 11. Rozhraní softwaru SIFT-MS při měření pentanu v dechu dobrovolníků v MIM módu. Na ose x je čas v sekundách a na ose y koncentrace pentanu v jednotkách ppb. Píky odpovídají jednotlivým výdechům dvou dobrovolníků, přičemž ti do přístroje vydechovali vždy střídavě. Na grafu lze pozorovat s časem klesající koncentraci pentanu v dechu u obou dobrovolníků.

5 Závěr

- Vlastním experimentem byla ověřena rychlostní konstanta reakce pentanu s prekurzorem O_2^{+} . Zároveň byly určeny iontové produkty reakce s jejich procentuálním zastoupením. Byla vytvořena knihovna umožňující měření koncentrace pentanu v reálném čase. Tím byla vyvinuta metoda k měření stopových koncentrací pentanu v lidském dechu.
- Podle předem stanoveného protokolu byly změřeny koncentrace pentanu v dechu 81 dobrovolníků ve věku 16-19 let. Pro ženy byla zjištěna průměrná koncentrace pentanu v dechu 23 ppb a pro muže 24 ppb. Byly tak získány vůbec první údaje o koncentraci pentanu v dechu zdravých jedinců měřených pomocí SIFT-MS.
- Podle stejného protokolu byly změřeny koncentrace pentanu v dechu 48 pacientů trpících IBD. U pacientů s Ulcerativní kolitidou byla zjištěna průměrná hodnota koncentrace 59 ppb a u pacientů s Crohnovou chorobou 56 ppb. Tyto hodnoty jsou v porovnání s hodnotami zdravých jedinců vyšší, jak se předpokládalo. Nicméně se jedná o pilotní studii a získaná data jsou zatím pouze předběžná. Ve výzkumu se plánuje pokračovat a měření provést důkladněji na větším množství pacientů.
- Z hlediska bezpečnosti práce byl sledován i exogenní pentan v dechu dvou dobrovolníků. V prvních sekundách po inhalaci par pentanu, při které nebyl překročen limit daný OSHA, bylo v dechu dobrovolníku naměřeno 5 ppm pentanu. Bylo pozorováno i odbourávání pentanu z dechu a zjištěna rychlost tohoto odbourávání. Koncentrace pentanu v dechu klesla za hodinu 115krát.

Literatura

1. Adams, N.; Smith D.: The selected ion flow tube (SIFT): a technique for studying thermal energy ion–neutral reactions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **21**, 349–359 (1976)
2. Smith, D.; Španěl, P.: Studies of Interstellar Ion reactions using the SIFT technique: Isotope fractionation. *Account of Chemical Research* **25**, 414-420 (1992)
3. Smith, D. ; Španěl P.: The Novel Selected-ion Flow Tube Approach to Trace Gas Analysis of Air and Breath. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **10**, 1183-1198 (1996)
4. Španěl, P.; Rolfe, P.; Rajan, B.; Smith, D.: The selected ion flow tube (SIFT) - a novel technique for biological monitoring. *The Annals of Occupational Hygiene* **40**, 615-626 (1996)
5. Španěl, P.; Smith, D.: Selected ion flow tube mass spectrometry for on-line trace gas analysis in biology and medicine. *European Journal of Mass spectrometry* **13**, 77-82 (1997)
6. Smith, D.; Španěl, P.: Selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) For on-line trace gas analysis. *Mass Spectrometry Reviews* **24**, 661– 700 (2005)
7. Španěl, P., Dryahina, K. and Smith, D.: A general method for the calculation of absolute trace gas concentrations in air and breath from selected ion flow tube mass spectrometry data, *International Journal of Mass Spectrometry* **249–250**, 230–239 (2006)
8. Smith, D.; Cheng, P.; Španěl, P.: Analysis of petrol and diesel vapour and vehicle engine exhaust gases using selected ion flow tube mass spektrometry, *Rapid Commun Mass Spectrometry* **16**, 1124–1134 (2002)
9. Davies, S.; Španěl, P.; Smith, D.: Quantitative analysis of ammonia on the breath of patients in end-stage renal failure, *Kidney International* **52**, 223-228 (1997)

-
10. Carroll, W.; Lenney, W.; Wang, T.S.; Španěl, P.; Alcock, A.; Smith, D.: Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry, *Pediatric Pulmonology* **39**, 452-456 (2005)
11. Amann, A.; Španěl, P.; Smith D.: The Approach towards clinical applications. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **7**, 115-129 (2007)
12. Manolis, A.: The Diagnostic Potential of Breath Analysis. *Clinical Chemistry* **29**, 5-15 (1983)
13. Enderby, B.; Smith, D.; Carroll, W: Hydrogen cyanide as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the breath of children with cystic fibrosis, *Pediatric Pulmonology* **44**, 142-147 (2009)
14. Endre, Z.H.; Pickering, J.W.; Storer, M.: Breath ammonia and trimethylamine allow real-time monitoring of haemodialysis efficacy, *Physiological Measurement* **32**, 115-130 (2011)
15. Dummer, J.; Storer, M.; Swanney, M. McEwan, M.; Thomas, A. S.; Bhandari, S.; Chambers, S.; Dweik R.; Epton, M.: Analysis of biogenic volatile organic compounds in human health and disease. *Trac-trends in analytical chemistry* **30**, 960-967 (2011)
16. Joseph, B.; Kirsner, X.: Inflammatory bowel disease part I: Nature and pathogenesis. *Disease-a-Month* **37**, 610–666 (1991)
17. Aghdassi, E.; Allard, J.:Breath alkanes as a marker of oxidative stress in different clinical conditions. *Free Radical Biology & Medicine* **28**, 880–886, (2000)
18. Kokoszka, J.; Nelson, R.; Swedler, W.; William I.; Skosey, J.; Abcarian, H.: Determination of inflammatory bowel disease activity by breath pentane analysis. *Disease of the colon and rectum* **36**, 597-601 (1993)
19. Sedghi, S.; Keshavarzian, A.; Klamut, M. ; Zarling, E.J.: Elevated breath ethane levels in active ulcerative-colitis-evidence for excessive lipid peroxidation, *American journal of gastroenterology* **89**, 2217-2221 (1994)

20. Pelli, M.; Trovarelli, G.; Capodicasa, E. De Medio, G.E; Bassotti G.: Breath alkanes determination in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Disease of the Colon Rectum* **42**, 71-76 (1999)

21. P. Španěl, D. Smith, A selected ion flow tube study of the reactions of NO^+ and O_2^+ ions with some organic molecules: The potential for trace gas analysis of air, *Journal of Chemical Physics*, **104**, 1893-1899 (1996)

22. P. Španěl and D. Smith: SIFT studies of the reactions of H_3O^+ , NO^+ and O_2^+ with several aromatic and aliphatic hydrocarbons, *International Journal of Mass Spectrometry* **181**, 1-10 (1998)