

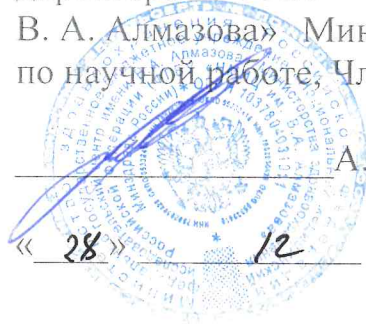
Министерство здравоохранения Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА»
(ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»)

УДК 616.1
Рег.№ НИОКТР
АААА-А18-118042390127-2

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель генерального
директора ФГБУ «НМИЦ им.
В. А. Алмазова» Минздрава России
по научной работе, Член-корр. РАН



А.О. Конради

« 28 » 12 201 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ ДИАГНОСТИКИ И ОЦЕНКИ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ СОЦИАЛЬНО-ЗНАЧИМЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА
МНОГОКОМПОНЕНТНОГО МИКРОАНАЛИЗА ВЫДЫХАЕМОГО
ВОЗДУХА
(промежуточный)

Руководитель темы
главный научн.сотр.,
доктор мед. наук

А.В. Березина

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы,
главный научный сотрудник
НИЛ кардиореспираторного
тестирования, доктор мед. наук



Березина А.В.
(глава 1,
заключение)

Исполнители:

Заведующий НИО физиологии
кровообращения,
канд. мед. наук



Козленок А.В.
(введение, глава 2,
глава 3,
заключение)

РЕФЕРАТ

Отчет 40 с., 9 рис., 5 табл., 1 схема, 51 источн., 1 прил.

УЛЬТРАМИКРОГАЗОАНАЛИЗ ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ, ЛЕТУЧИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА, МАРКЕРЫ, СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, ОНКОЛОГИЯ

Целью данного научного проекта является разработка новой медицинской технологии скрининговой диагностики онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний на основе ультрамикрогазоанализа выдыхаемого воздуха. Согласно плану исследования, первый этап заключается в создании исходной базы биомаркеров социально-значимых заболеваний и усовершенствование технологии масс-спектрометрического газоанализа.

Подготовлен обзор литературных источников, объединяющий современные представления о летучих органических веществах, являющихся биомаркерами заболеваний. Теоретически обоснована методология исследования.

Предложен новый тип магнитного статического масс-анализатора с двойной фокусировкой для масс-спектрографии в диапазоне массовых чисел 30-300 и показаны его преимущества. Рассмотрены особенности реализации ионно-оптической схемы масс-спектрографа. Рассмотрены особенности источника ионов типа Нира с электронной ионизацией и некоторые общепринятые решения его реализации. Предложен новый вариант ионно-оптической системы источника ионов, обеспечивающий увеличение сбора ионов без потери стабильности работы источника. Изложены базовые представления теории транспортировки ионов, обеспечивающие оптимальное объединение источника ионов и масс-анализатора.

Проведено сопряжение координатно-чувствительного детектора (КЧД) с малогабаритным масс-спектрометром, созданным в предшествующие циклы государственного задания. Сопоставлены данные измерений, полученные с помощью масс-спектрографа с применением КЧД и канального вторичного электронного умножителя.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Основная часть.....	5
Глава 1. Исследование выдыхаемого воздуха в медицинской практике: настоящее и будущее.	Ошибка! Закладка не определена.
Перспективы и результаты исследований выдыхаемого воздуха при неинфекционных заболеваниях.....	10
Сердечно-сосудистые заболевания	Ошибка! Закладка не определена.
Диагностика онкологических заболеваний легких... ..	Ошибка! Закладка не определена.
Возможности использования результатов анализа выдыхаемого воздуха для диагностики онкологических заболеваний других органов	15
Глава 2. Разработка, расчет и оптимизация ионно-оптической схемы малогабаритного масс-спектрографа с двойной фокусировкой типа Маттауха-Герцога для регистрации состава выдыхаемого воздуха и разработка, расчет и оптимизация источника ионов с низким уровнем дискриминаций (работа выполнена Институтом аналитического приборостроения РАН для ООО «АэроСенс» - малого инновационного предприятия ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России).	20
Источник ионов типа Нира с электронной ионизацией: основные положения, определяющие разработку источника ионов масс-спектрографа	21
Электронно-оптическая система источника ионов и основные требования к ней ..	Ошибка! Закладка не определена.
Принципы рассмотрения и расчета ионно-оптической системы источника ионов: некоторые сведения из теории транспортировки пучков.....	27
Ионно-оптическая система масс-анализатора	30
Глава 3. Сопряжение координатно-чувствительного детектора с портативным статическим масс-спектрографом (работа выполнена Физико-техническим институтом им. А.Ф. Иоффе РАН для ООО «АэроСенс» - малого инновационного предприятия ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России)	32
Заключение.....	35
Список использованной литературы	37
Приложение А Список публикаций по теме исследования	41

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВ – выдыхаемый воздух

ИОС – ионно-оптическая схема

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТС – трансплантация сердца

ВВЕДЕНИЕ

Выполнение работ по теме «Создание технологий диагностики и оценки эффективности лечения социально-значимых заболеваний с использованием метода многокомпонентного микроанализа выдыхаемого воздуха» направлено на решение комплекса теоретических и прикладных задач, относящихся к развитию масс-анализаторов и оптических систем получения ионов и формирования ионных пучков, а также на разработку теоретических принципов управления движением ионов с целью создания новых высокоэффективных масс-анализаторов, в том числе совместимых с источниками ионов с электрораспылительным анализом пробы конденсата. При этом все разрабатываемые системы и методы ориентированы на решение медико-биологических задач: использование масс-спектрометрии для медицинской диагностики по анализу масс-спектров выдыхаемого воздуха, разработке новых масс-спектрометрических методик и реализующих их устройств в реальном масштабе времени. Работы в этом направлении сопровождаются разработкой алгоритмов и программно-технических средств для реализации разрабатываемых медицинских методик.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. Исследование выдыхаемого воздуха в медицинской практике: настоящее и будущее.

Попытка анализировать выдыхаемый воздух имеет давнюю историю. Так, еще врачи Древней Греции заметили, что при некоторых заболеваниях выдыхаемый воздух пациента имеет специфический запах, и они справедливо предположили, что это обусловлено патологическими метаболическими процессами, которые происходят в организме человека при том или ином заболевании. С развитием науки было установлено, что запах ацетона в выдыхаемом воздухе ассоциируется с декомпенсацией сахарного диабета, а «рыбный» запах обусловлен заболеванием печени, запах мочевины – заболеванием почек [1,2,3]. Современная история анализа выдыхаемого воздуха (ВВ) начинается с 1970 года, когда Pauling с помощью хроматографии определил, что в состав ВВ помимо кислорода, азота, воды и углекислого газа, входят и другие летучие вещества. Таким образом, было доказано, что состав ВВ у здорового человека сложный и разнообразный. Более того, в результате исследований проб ВВ было установлено, что состав ВВ больных и здоровых существенно отличается, что позволило предположить возможность использования результатов анализа ВВ в практической медицине с целью диагностики и мониторинга различных заболеваний.

Приблизительно 3000 летучих органических частиц были определены в пробах ВВ у человека и в однократной пробе может содержаться более 200 различных веществ [4,5]. Установлено, что состав ВВ содержит небольшие неорганические частицы такие как NO, O₂, CO₂, летучие органические частицы – водород, кетоны, алкоголь, альдегид и esters, а также нелетучие субстанции такие как изопропан, цитокины, лейкотриены, пероксид водорода, которые можно определить в конденсате ВВ [6]. Установлено, что большинство летучих органических веществ в ВВ – это алканы (изопрен, ацетон, этанол, метанол и другие [7]. Вместе с тем, доказано, что состав ВВ зависит от окружающей среды, питания, физического состояния (покой или физическая активность), здоровья человека, пола, этнической принадлежности, возраста. Кроме того, на сегодняшний день, не

установлен источник и физиологическая функция очень многих летучих органических частиц, определяемых в ВВ. Тем не менее, в результате исследований были установлены источники происхождения ряда веществ, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1. Летучие соединения физиологического происхождения

Соединение	Физиологическая основа
Ацетальдегид	Метаболизм Этанол (Norberg et al., 2003; Turner et al., 2003)
Ацетон	Декарбоксилирование ацетоацетата и ацетил-КоА
Этан	Перекисное окисление липидов (Schubert et al., 2004)
Этилен	Перекисное окисление липидов (Risby, 2005)
Гидроген	Кишечные бактерии (Ledochowski et al, 2001)
Изопрен	Биосинтез холестерина (Stone et al., 1993)
Метан	Кишечные бактерии (Ledochowski et al, 2001)
Метиламин	Белковый обмен (Risby, 2005)
Пентан	Перекисное окисление липидов (Schubert et al., 2004)

В результате исследований состава ВВ у здоровых и больных различными заболеваниями, были выявлены летучие вещества, концентрация которых в группах различалась, что позволило исследователям рассматривать эти вещества как биомаркеры тех или иных патологических состояний (таб.2).

Таблица 2. Летучие органические соединения – биомаркеры заболеваний

Соединение	Заболевание
Этан и пентан	Оксидативный стресс
Метилированные углеводороды	Рак легкого или молочной железы
Углеводороды (в особенности этан и пентан)	Оксидативный стресс
Изопрен	Метаболизм холестерина
Ацетон	Кетонемия при сахарном диабете
Серосодержащие соединения (диметилсульфид, метилмеркаптан, этилмеркаптан)	Поражения печени
Нитросодержащие соединения (аммиак, диметиламин, триметиламин)	Уремия, заболевания почек

Однако, как известно, например, оксидативный стресс наблюдается при очень многих заболеваниях и, соответственно, точно определить какое именно заболевание обуславливает оксидативный стресс на основании этих биомаркеров, на сегодняшний день не представляется возможным.

Для диагностики какого-либо заболевания на основании анализа проб

выдыхаемого воздуха необходимо выявить группу маркеров, специфичную для данного заболевания. Причем наличие и/или происхождение этих летучих веществ в пробе ВВ должно быть объяснено и/или подтверждено с точки зрения метаболических процессов, происходящих в организме при том, или ином заболевании.

Сложность состава ВВ требует использования только самых передовых методов газоанализа, удовлетворяющих самым жестким аналитическим требованиям. Анализ ВВ имеет ряд несомненных преимуществ перед традиционными методами диагностики. К этим преимуществам можно отнести: неинвазивность, безопасность, безболезненность, простота исполнения, возможность многократного взятия образцов, быстрота получения результатов анализа, неограниченный контингент обследуемых и отсутствие противопоказаний, дешевизна [22,23,24]. Вместе с тем, несмотря на все преимущества, анализ ВВ в настоящее время широко не используется в медицинской практике и разрешен к применению только при определенных состояниях и областях медицины. Так, в настоящее время, оценка концентрации этанола и ацетальдегида используется для определения приема алкоголя и степени опьянения, дыхательный тест с C^{13} -urea или аммония – для диагностики *H. pylori*, а исследование концентрации NO в ВВ – для диагностики и мониторинга течения бронхиальной астмы [25,26]. Кроме того, стандартная капнография – определение концентрации CO_2 в ВВ используется для мониторинга газообмена больных в реанимации и анестезиологии.

Определение динамики потребления O_2 и выделения CO_2 в условиях физической нагрузки (эргоспирометрия) используется для диагностики, оценки эффективности терапии, прогноза и решения вопроса о трансплантации сердца и легких в кардиологии и пульмонологии [27].

Узость применения результатов анализа ВВ в медицинской практике обусловлена рядом существенных недостатков этого метода, к которым можно отнести: отсутствие стандартизации, оценочных критериев и автоматизации процесса определения летучих веществ, незнание механизмов происхождения тех или иных летучих соединений.

Таким образом, на сегодняшний день для внедрения результатов анализа выдыхаемого воздуха в медицинскую практику требуется решить ряд важнейших задач, касающихся методологии и приборостроения. С точки зрения медицины, перспектива работы в данном направлении представлена на схеме 1.

Методология поиска новых маркеров заболеваний



Boots AW et al., J. Breath Res. 6 (2012) 027108

Перспективы и результаты исследований выдыхаемого воздуха при неинфекционных заболеваниях

Сердечно-сосудистые заболевания

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) и их осложнения являются одной из ведущих причин смертности во всем мире. Поэтому ранняя диагностика, эффективная терапия, оценка динамики и прогноза этих заболеваний имеет важное значение.

Биомаркеры оксидативного стресса в ВВ у больных нестабильной стенокардией

Боль за грудиной сопровождается оксидативным стрессом, при котором

образуются алканы и другие летучие органические вещества. Эти вещества выделяются легкими и могут быть потенциальными диагностическими маркерами заболевания. Для дифференциальной диагностики болей в грудной клетке ведётся поиск новых диагностических маркеров, которые позволили бы отличить пациентов высокого риска с «сердечными» болями, требующими немедленной госпитализации от пациентов с «несердечными» болями в грудной клетке, не требующих экстренной медицинской помощи. Одним из таких «скрининговых» диагностических методов может быть анализ ВВ. Хорошо известно, что этан и пентан, определяемые в ВВ являются продуктами оксидативного стресса, и определяются при различных заболеваниях. Phillips и соавторы (2003), провели пилотное исследование по анализу ВВ у больных с нестабильной стенокардией и здоровых лиц, сопоставимых по возрасту. Был проведен анализ метилированных алканов C4-C20 и монометилированных алканов в ВВ обеих групп. При статистической обработке полученных результатов были выявлены 8 летучих органических вещества, концентрация которых значимо различалась в анализируемых группах (табл. 4). Причем чувствительность составила 90%, а специфичность – 73,7%.

Таблица 4. Летучие органические соединения – детекторы нестабильной стенокардии

Компонент	P
Октан, 4-метил-	<0.001
Декан, 4-метил-	<0.001
Гексан	<0.001
Пентадекан, 5-метил-	<0.001
Гексадекан, 7-метил-	<0.001
Пропан, 2-метил-	<0.001
Пентан	<0.001
Бутан, 2-метил-	<0.02

Диагностика отторжения донорского сердца у реципиентов с помощью анализа выдыхаемого воздуха (HARDBALL Study, Phillips et al., 2004)

Эндомиокардиальная биопсия правого желудочка является «золотым стандартом» диагностики отторжения донорского сердца и выполняется еженедельно в первые 6 недель после трансплантации сердца (ТС), раз в 2 недели в течение 3 месяцев, ежемесячно в течение 6 месяцев и 1 раз в 3 месяца в

последующем после ТС. Причем, в большинстве случаев результаты биопсии в норме, или близки к норме, что не требует коррекции терапии соответственно. Вместе с тем, эта процедура с одной стороны дорогостоящая, требующая госпитализации пациента в специализированный стационар, с другой – инвазивная, а значит может вызвать осложнения, такие как гематома, инфекции, аритмии, перфорация или образование фистулы желудочка. В последние годы были сделаны попытки диагностики отторжения сердца неинвазивными способами с помощью функциональных исследований такими как магнитно-резонансная томография, эхокардиография, а также с помощью сывороточных маркеров, такими как определение уровней тропонин I, тропонин T, фракции КФК-МВ, СРБ [28]. Однако точность предложенных методов диагностики отторжения сердца оказалась низкой.

Целесообразность использования анализа выдыхаемого воздуха для диагностики отторжения сердца, по мнению Phillips M., базируется на 2 принципах: 1 - отторжение сердца сопровождается оксидативным стрессом вследствие увеличения продукции реактивного O_2 (ROS) в миокарде; 2 - ROS разрушает клеточные мембраны путем перекисного окисления липидов полиненасыщенных жирных кислот, продуцирующих алканы, которые выводятся из организма при дыхании в виде летучих органических веществ [29]. Эти вещества могут служить маркерами интенсивности отторжения. Phillips M., и соавторы провели анализ ВВ концентрации алканов C4-C20 и монометилалканов с помощью хроматографии и масс-спектрометрии у реципиентов после ТС с разной степенью отторжения, которое было определено методом эндомиокардиальной биопсии. Была выявлена комбинация из 9 алканов, характеризующих 3-ю степень отторжения сердца (табл. 5).

Таблица 5. Летучие органические компоненты для идентификации отторжения при трансплантации сердца

Соединения	Функция 1	Функция 2
Пропан, 2-метил-	0.418	0.144
Октадекан, 5-метил	9.301	-19.316
Октадекан, 6-метил	- 4.730	0.318
Гептадекан, 2 метил	6.221	14.796
Октан	0.714	-0.010
Гептан, 2-метил	-1.193	-0.166

Ундекан, 3-метил	0.121	0.239
Октадекан, 2-метил	-7.237	16.031
Гексадекан, 2-мети (константа)	-5.637 -.007	14.908 0.042

При этом чувствительность метода составила – 78,6%, а специфичность – 62,4%. Положительное предсказующее значение составило – 5,6%, а негативное предсказующее значение – 97,2%. Чувствительность и специфичность биопсий в этих же случаях составила – 42,4% и 97,0%, соответственно, а позитивная и негативная предсказующая ценность – 45,2% и 96,7% соответственно. Таким образом, маркеры оксидативного стресса, определяемые в ВВ более чувствительны, но менее специфичны для отторжения сердца 3 степени, чем биопсия. Вместе с тем отрицательная предсказующая ценность была сопоставима между методами. Авторы делают вывод, что скрининговый анализ выдыхаемого воздуха у реципиентов позволит выявить среди них пациентов с низким риском отторжения 3 степени и позволит уменьшить количество эндомикардиальных биопсий у этой категории больных более чем на 50% [30].

Диагностика онкологических заболеваний легких

Онкологические заболевания легких являются одной из ведущих причин смерти во всем мире. Это обусловлено поздней диагностикой, чаще всего при 4 стадии заболевания, что негативно влияет на прогноз и выживаемость. Известно, что 5-летняя выживаемость от всех типов рака легких не превышает 15% [10]. Поэтому ранняя диагностика всех видов рака легких имеет большое значение. В настоящее время, для диагностики онкологических заболеваний легких используется: компьютерная томография, ядерно-магнитный резонанс, позитронно-эмиссионная томография, и другие дорогостоящие методы исследования [40]. Однако некоторые из этих методов инвазивные и небезопасные для пациентов. Так же для диагностики онкологии используются и молекулярные биомаркеры такие как нуклеиновые кислоты, пептиды, липиды, углеводы, которые отражают патологическое состояние органов и ответ на лечение [41]. Вместе с тем, количество таких молекул в организме огромно, и поэтому анализ результатов очень сложный и требует длительного времени [42]. Поэтому, анализ веществ в ВВ выглядит как

преимущественный метод ранней диагностики онкологических заболеваний легких в виду его дешевизны, легкости и быстроты исполнения и неинвазивности.

К настоящему времени проведено лишь 1 исследование, изучающее профиль летучих веществ у больных 4 видами рака легких *in vivo* и проведен анализ летучих веществ над опухолевыми клетками (squamous, bronchioloalveolar, non-small and adenocarcinoma cells) этих же больных *in vitro* (Chen et al.). Исследователями было установлено, что летучие органические вещества, определяемые *in vitro*, не только значительно отличались от тех, которые определялись в ВВ здоровых, но и было выявлено 4 универсальных вещества, которые являются продуктами метаболизма опухолевых клеток легких, а значит могут быть биомаркерами рака легких на клеточном уровне. Интересно то, что 2 вещества из 4 – изопрен и андекан, определялись *in vivo* в ВВ больных. Вместе с тем найденные существенные различия в ВВ *in vivo* и *in vitro*, указывает на необходимость исследования летучих органических веществ в обоих условиях для установления достоверных биомаркеров рака легких.

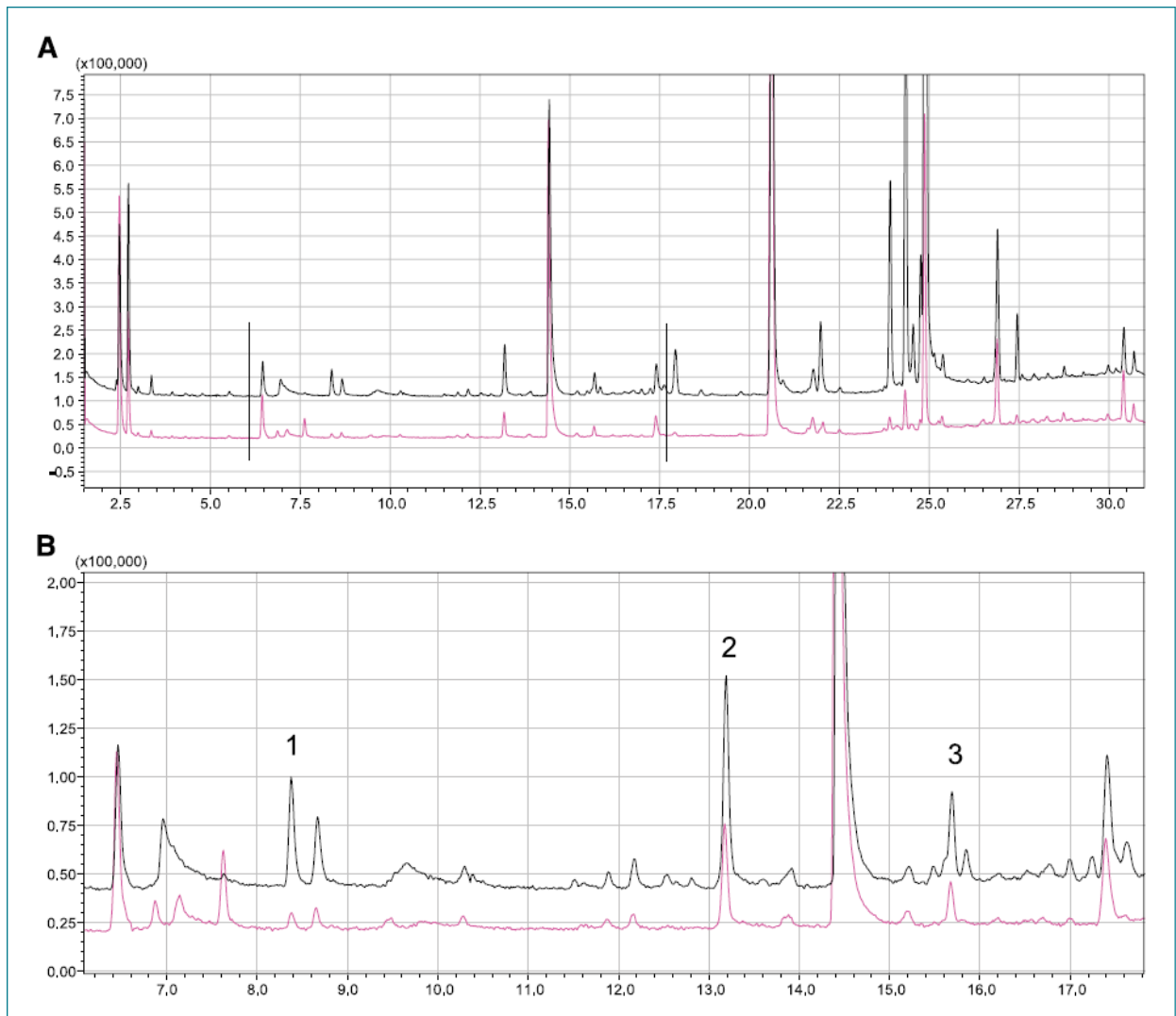
За последние годы были проведены исследования по анализу воздуха над клеточными культурами различных видов рака. Установлено, что при non-small-cell lung cancer cell-line CALU-1 увеличивается концентрация 2,3,3-триметилпентана, 2,3,5-триметилгексана, 2,4-диметилпентана и 4-метилоктана и определяется низкая концентрация ацетальдегида, акролина, 2-бутанона и гексала. При small-cell lung cancer cell-line NCI-H-1666 извлеченной из бронхоальвеолярной карциномы так же были выделены некоторые альдегиды, 2 ethers и n-бутилацетат. При анализе воздуха над линией клеток NCI-H2087, извлеченных из метастатических легких при аденокарциноме, выявлен низкий уровень ацетальдегида, 2-метилпропана, 2- и 3-метилбутана и бутилацетата и высокий уровень 2-этил-1-гексанола и 2-метилпентана. При сравнении концентрации летучих веществ над раковыми клетками линии A549 и неизменными эпителиальными бронхиальными клетками, были установлены во-первых разные летучие вещества, и во-вторых, вещества, преимущественно ассоциированные с метаболизмом злокачественных клеток. Таким образом, исследования летучих веществ над

разными клеточными культурами показали и разнообразие выделяемых веществ. Поэтому, необходимы дополнительные исследования для установления причин этих различий и выявления, уникальных или специфических биомаркеров рака легких, характерных для разных видов и стадии рака легких.

Возможности использования результатов анализа выдыхаемого воздуха для диагностики онкологических заболеваний других органов

Печеночно-клеточная карцинома

Стандартным скрининговым методом диагностики печеночно-клеточной карциномы является УЗИ брюшной полости и определение альфа-фетопротеина (AFP). Однако около 30% больных с первичной карциномой печени серонегативны по AFP. Китайские ученые исследовали и сравнили ВВ у больных гепатоцеллюлярной карциномой, ассоциированной с гепатитом В и циррозом, больных с циррозом печени и здоровых лиц методом GCMS [48]. Статистический анализ проведен с использованием ROC- кривых и дискриминантной функцией. Так же была оценена связь между веществами, определяемыми в ВВ и уровнем альфа-фетопротеина. Установлено, что 3-гидрокси-2-бутанон, стерин и декан могут быть потенциальными маркерами диагностики первичного рака печени, причем наибольшее диагностическое значение имеет первый из перечисленных. Диагностическая функция этих маркеров имела чувствительность 86,7% и специфичность 91,7% между больными гепатоклеточной карциномой и здоровыми людьми. При этом не выявлено достоверных различий концентраций этих маркеров при уровне AFP >400 или <400 мкг/л и между I-II и III-IV стадиями заболевания. Исследователи сделали вывод, что найденные вещества могут быть использованы в качестве маркеров гепатоцеллюлярной карциномы, независимо от уровня альфа-фетопротеина.



Сравнение хроматографических показателей между контрольной группой и пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой. А. График исследования в течение 31 мин. В. График увеличенной части в А между двумя вертикальными линиями. Красный график – здоровая контрольная группа некурящих мужчин 52 лет. Черный график – пациенты с гепатоцеллюлярной карциномой – 50-тилетние некурящие мужчины, стадия заболевания ПА, уровень альфафетопротеина 219,2 мг/л. Несколько исследований было посвящено изучению ВВ с целью диагностики заболеваний печени. Предполагаемыми биомаркерами рассматривались: серосодержащие вещества, такие как диметилсульфид, сульфид водорода и меркаптан. Известно, что уровень аммиака в крови возрастает, когда печень не может конвертировать его в мочевины, что встречается при циррозе и тяжелом гепатите. Однако большинство аммиака образуется в ротовой

полости вследствие функционирования бактерий или ферментов. Поэтому концентрация аммиака в выдыхаемом воздухе не может служить надежным маркером нарушения функции печени. Пилотное исследование было проведено группой Van den Velde и соавторами, в котором было выявлено 12 летучих органических веществ, разделяющих больных циррозом печени от здоровых [49].

Диагностика рака молочной железы по анализу выдыхаемого воздуха

Рак молочной железы сопровождается повышенным оксидативным стрессом, вследствие перекисного окисления липидов полиненасыщенных жирных кислот в мембранах, продуцирующих алканы и метилалканы, такие как 3-метиландекан, 6-метилпентадекан, 2-метилпропан. Nietanen et.al., установили, что у больных раком груди концентрация пентана выше, чем у здоровых. Так же была оценена предсказующая ценность рака груди с использованием летучих биомаркеров. Были установлены 5 биомаркеров рака груди – 2-пропанол, 2,3-дигидро1-фенил-4-куиназолин, 1-фенил-этанон, гептанал и изоприл мирилат. Предсказующая ценность оценивалась с помощью ROC-кривых и составила 93,8% чувствительности и 84,6% специфичности. Подобная модель была получена и для женщин с ненормальной маммографией, но без рака груди по биопсии. Таким образом, комбинация этих веществ предсказывает наличие или отсутствие рака груди [51].

Колоректальный рак и летучие органические вещества в выдыхаемом воздухе

Известно, что колоректальный рак обусловлен сочетанием генетической предрасположенности с факторами внешней среды – ожирением, низким уровнем физической активности и питанием. Установлено, что питание значительно влияет и потенцирует рост злокачественных клеток, особенно красное мясо. Следовательно, питание может оказывать влияние на состав ВВ. Например, питание с пониженным

содержанием жира потенцирует кетоз, ведущий к увеличению уровня ацетона в ВВ. Расщепление углеводов бактериями кишечника приводит к продукции водорода, метана, диоксида углерода и коротких цепей ЖК, преимущественно ацетата, пропионата и бутирата как основных негазовых продуктов брожения. Ранее измерение водорода в ВВ использовали для изучения абсорбции углеводов в тонком кишечнике, а метана для оценки кишечного бактериального метаболизма. Бутиран рассматривался как протектор против колита и колоректального рака. Кишечные бактерии играют важную роль в образовании большинства веществ, присутствующих в ВВ, таких как водород, цианид водорода, альдегиды и алканы. Altomare et al., используя для анализа ВВ GCMS выявили паттерн летучих веществ, характерных для больных колоректальным раком. Это 1,3-диметилбензин, 1,2-пентадиен, циклогексан и метилциклогексан. Однако требуются дополнительные исследования для подтверждения данного результата.

ГЛАВА 2. Разработка, расчет и оптимизация ионно-оптической схемы малогабаритного масс-спектрографа с двойной фокусировкой типа Маттауха-Герцога для регистрации состава выдыхаемого воздуха и разработка, расчет и оптимизация источника ионов с низким уровнем дискриминаций (работа выполнена Институтом аналитического приборостроения РАН для ООО «АэроСенс» - малого инновационного предприятия ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России)

Настоящая работа направлена на создание ионно-оптической схемы для специализированного масс-спектрографа, предназначенного для регистрации состава примесей выдыхаемого воздуха в спектрографическом режиме в интервале массовых чисел от 25 до 300 а.е.м. При этом ионно-оптическая схема (ИОС) должна в наибольшей степени отвечать требованиям технологичности и простоты исполнения.

ИОС масс-анализатора должна базироваться на масс-анализаторе, построенном по схеме типа Маттауха-Герцога и включает в себя следующие ионно-оптические элементы: полюсные наконечники диспергирующего магнита, магнитные экраны, энергодиспергирующие узлы, фокусирующие линзы, коллиматорные диафрагмы, входную щель источника ионов, положение и форму линии фокусов. Масс-анализатор должен обеспечивать получение разрешающей способности не ниже 300 на 10% высоты ионного пика для ионов с массовым числом 300 и максимально прямую линию фокусов в интервале массовых чисел 25-300 а.е.м. Дисперсия масс-анализатора является компромиссной между требованием максимально большой возможной чувствительности, определяемой выходной щелью источника ионов, и общими габаритами масс-спектрометра: ИОС должна вписываться в прямоугольник размером не более 550 x 380 ± 30 мм. Основные технические требования к ИОС масс-анализатора и источника ионов и ее составным частям определяются как показателями назначения, так и отсутствием в схеме ионно-оптических элементов сложной формы.

ИОС источника ионов типа Нира с электронной ионизацией выбирается из условий максимальной чувствительности анализа и максимального устранения дискриминаций по массе при формировании ионного пучка. ИОС включает в себя камеру ионизации, электронно-оптическую систему: катодный блок, коллектор электронов и магнитную систему фокусировки электронного пучка, и иммерсионную (ускоряющую) ионно-оптическую систему с указанием размеров электродов и их потенциалов. В данном варианте реализации ИОС масс-спектрографа

ионизационная камера источника находится под максимальным (ускоряющим) положительным потенциалом, а выходная щель источника ионов и масс-анализатор – под потенциалом Земли.

Источник ионов типа Нира с электронной ионизацией: основные положения, определяющие разработку источника ионов масс-спектрографа

Общая информация о причинах выбора источника типа Нира. Достоинства и недостатки источника ионов этого типа

Источник ионов является частью ионно-оптической системы любого аналитического масс-спектрометра. Принципиальная типовая схема источника ионов с электронной ионизацией для анализа газов и паров легколетучих веществ формируется под влиянием двух основных задач, решаемых источником: ионизации вводимой в источник газовой смеси (электронно-оптическая система источника) и формирования пучка из образовавшихся в области ионизации ионов (ионно-оптическая система источника). Описанию и исследованию параметров источников ионов различных типов посвящена обширная литература, среди которой есть не только многочисленные статьи, но и монографии. Из анализа литературы следует, что одной из наиболее удачных ионно-оптических схем источников ионов с электронной ионизацией, основные черты которой сохранились в большинстве современных конструкций таких источников, явилась схема, предложенная А. Ниром в 1940 году. Эта схема приведена на рис.1.



Рис.1. Схема ионного источника А. Нира образца 1940 года:

1 - постоянный магнит источника ионов; 2 - катод; 3 - выталкивающий электрод (в настоящее время не используется); 4 - поток ионизирующих электронов через ионизационную камеру; 5 - коллектор электронов; 6 – направление пучка ионов, отобранных из ионизационной камеры; 7 - ввод анализируемого вещества (пробы).

За время более чем столетнего существования масс-спектрометрии вопросам построения и усовершенствования ионно-оптической системы источников ионов посвящены сотни работ, изобретались и опробовались десятки различных способов сочетания области ионизации и способов отбора из нее ионов с дальнейшим формированием ионного пучка, однако требования, предъявляемые к источникам ионов масс-спектрометров в части ионизации и формирования пучка настолько многочисленны и противоречивы, что улучшение параметров одной из систем источника, одного из его узлов без надлежащего увязывания с работой остальных систем, не только не приводит к улучшению всех параметров источника ионов, но может привести к изменению и ухудшению характеристик масс-спектрометра в целом. Важным результатом многолетних усилий масс-спектрометрического сообщества и результатом всех теоретических и экспериментальных работ, посвященных источникам ионов, явилось то, что в мировой масс-спектрометрии в качестве наиболее используемого закрепился источник ионов типа Нира, апробированный в сотнях типов масс-спектрометров для анализа газов. Все реализации источников ионов этого типа в основном повторяют его принципиальную схему, приведенную на рис.1, а именно, взаимно перпендикулярное движение электронного и ионного пучков.

Абсолютным достоинством ионно-оптической схемы источника типа Нира, объясняющим ее долговечность и универсальность применения, является высокая стабильность ионного тока и геометрических параметров сформированного ионного пучка, незаменимая в аналитических применениях масс-спектрометрии. Основным недостатком этой схемы напрямую вытекает из ее достоинства: поскольку стабильность работы источника достигается за счет коллимации (вырезания лишь середины) пучка ионов, использование такого источника приводит к заметной потере чувствительности анализа. Желание уменьшить потери интенсивности стимулирует попытки оптимизации ИОС источника в его модификациях для различных конкретных применений, и в настоящее время благодаря возможностям компьютерных расчетов появилось множество вариантов ИОС источника типа Нира, не нарушающих его принципиальной организации, но позволяющих улучшить отбор ионов и их фокусировку и тем самым поднять

чувствительность. Вторым существенным и непреодолимый недостаток ИОС этого источника связан с необходимостью использовать дополнительное магнитное поле, обеспечивающее поддержание пространственного положения электронного пучка в области ионизации. Это поле, являющееся необходимым элементом электронной системы источника, для его ионной системы является причиной зависимости отбора образовавшихся ионов от их массы и начальной энергии (дискриминации при отборе ионов), влияющей на состав ионов в формируемом пучке. При неудачном выборе этой магнитной системы состав ионного пучка может быть существенно обеднен ионами легких масс по сравнению с тяжелыми. Этот недостаток особенно важно учитывать для масс-спектрографа, в котором предполагается одновременная регистрация ионов, отличающихся по массе на порядок.

В источнике типа Нира ионизация вещества, вводимого через систему напуска, производится в ионизационной камере, которая представляет собой, как правило, прямоугольную коробочку, более или менее пространственно изолированную стенками из немагнитного хромо-никелевого сплава, нержавеющей стали, титана, молибдена, золота и т.д. с четырьмя отверстиями: два для обеспечения сквозного прохода электронов, одно – для ввода анализируемого газа (пробы) и одно – для вывода ионов, образовавшихся при ионизации. Давление газовой пробы в ионизационной камере не превышает 10^{-2} Па. Ионизирующие электроны эмитируются, как правило, прямонакальным вольфрамовым или ренийевым катодом и ускоряются в направлении ионизационной камеры разностью потенциалов, изменяющейся в большинстве случаев в пределах от 50 до 100 эВ и называемой ионизирующим напряжением. Электроны входят в камеру через щель в ее передней стенке, и нерассеянная часть электронного пучка, вышедшая из ионизационной камеры через щель в противоположной катоду стенке, регистрируется коллектором электронов. Стабильность электронного пучка в течение всего времени работы прибора обеспечивается стабилизацией тока накала катода.

Полный ток положительных ионов I_+ , образующихся в ионизационной камере, измеряется в амперах и определяется выражением $I_+ = \sigma I_e p l$

где: σ – величина дифференциальной ионизации, ион/эл.см.мм рт.ст.

I_e – ток ионизирующих электронов, А;

p – давление ионизируемых веществ в области ионизации, мм рт.ст.;

l – длина пробега электронов в газе, см.

Величина σ показывает, сколько однозарядных ионов образует электрон с данной энергией на 1 см своего пути через объем газа при давлении 1 мм

рт.ст. Величина σ зависит не только от энергии электронов, где для большинства простых молекул имеется максимум для получения однозарядных ионов в области энергии 70–100 эВ (рис.2), но и от температуры. Фокусировка пучка ионизирующих электронов, как правило, осуществляется системой прикатодных электродов, а положение электронного пучка внутри камеры поддерживается продольным магнитным полем от специальных магнитов.

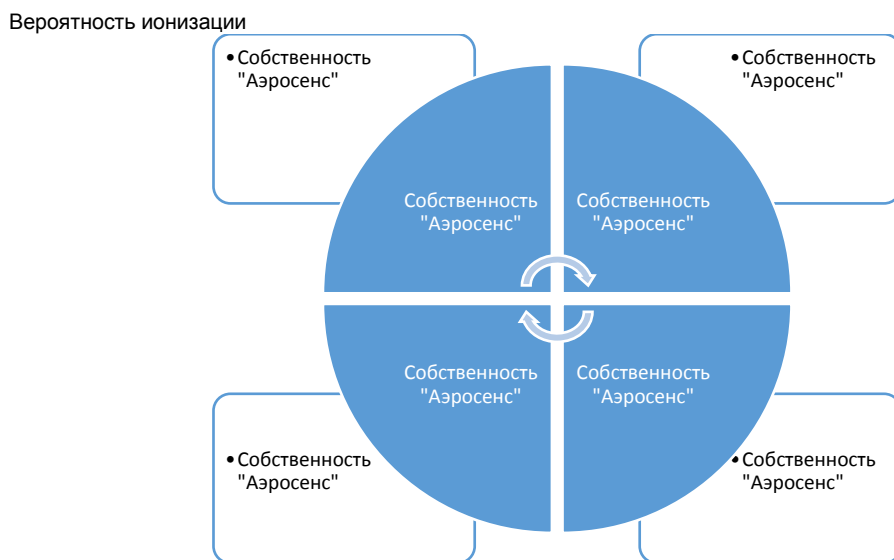


Рис. 2. Зависимость вероятности ионизации σ от энергии ионизирующих электронов для различных газов.

Анализируемое вещество в виде газа или пара вводится в область ионизации через отверстие в какой-либо стенке ионизационной камеры, и, если площадь щелей в камере существенно меньше площади её стенок, молекулы пробы равномерно заполняют объем ионизационной камеры. Если давление пробы p в камере не превышает 10^{-4} мм.рт.ст (длина свободного пробега молекул 5 см), то молекулы практически сталкиваются только со стенками ионизационной камеры и их кинетическая энергия определяется только температурой стенок T^0 (молекулы пробы термализуются). Для анализа термически неустойчивых молекул, к которым принадлежат многие молекулы органических веществ, это означает, что необходимо принять меры к выравниванию температуры стенок ионизационной камеры за счет их толщины и материала. В случае особо неустойчивых веществ и для предотвращения в этом случае взаимодействия молекул пробы со стенками ионизационной камеры ввод пробы может осуществляться в виде сформированного молекулярного пучка. В этом случае применяется так называемая «открытая» ионизационная камера, в которой молекулярный поток пробы проходит, не касаясь ее стенок, а газовая составляющая

свободно откачивается из ионизационной камеры. Ионно-оптическая схема такого, наиболее сложного случая, приведена на рис.3.

В разрабатываемом варианте масс-спектрографа предполагается анализ достаточно стабильных веществ, и напуск газовой смеси предполагается производить обычным способом: в закрытую ионизационную камеру через отверстие в ее боковой стенке.

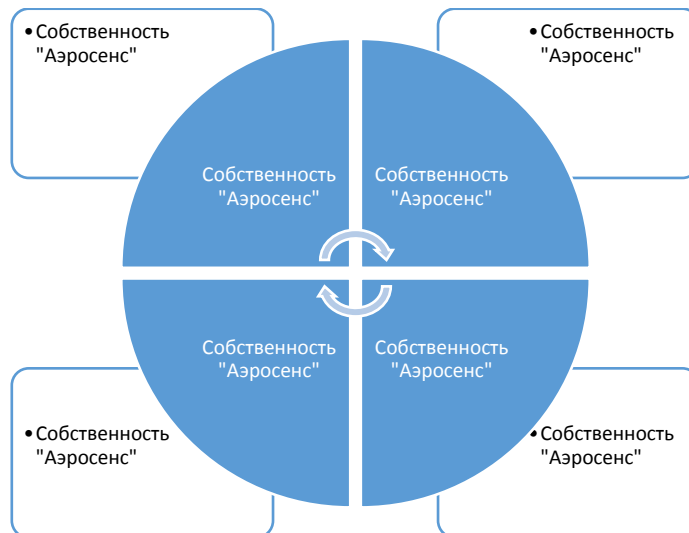


Рис.3. Ионизационная камера «открытого» типа с источником молекулярного (зеленый) пучка. Желтым показан пучок ионизирующих электронов. Образовавшиеся в зоне пересечения ионы отбираются ионно-оптической системой в направлении, перпендикулярном плоскости рисунка (на рисунке отсутствует).

Для вывода образовавшихся ионов и формирования ионного пучка в источнике ионов существует иммерсионная ионно-оптическая система. Ионы из ионизационной камеры вытягиваются последовательно нарастающей разностью потенциалов между электродами этой системы, расположение которых и распределение потенциалов таково, чтобы в результате сфокусировать максимальное число образовавшихся ионов на выходную щель ионно-оптической системы. При этом ускоряющее ионы напряжение, составляющее, как правило, несколько киловольт, прикладывается между ионизационной камерой и последним (выходным) электродом ионно-оптической системы источника. Эта система будет подробно рассмотрена далее.

Таким образом, процесс формирования ионного пучка в источнике с электронным ударом можно условно разделить на следующие стадии: напуск исследуемого вещества в область ионизации, получение и формирование электронного пучка, собственно ионизация, отбор ионов из области ионизации и формирование их в пучок в процессе увеличения их энергии (ускорения). При этом в источнике ионов типа Нира электронно-оптическая и ионно-оптическая системы расположены взаимно перпендикулярно и

связаны друг с другом только положением и формой области, в которой образуются ионы. Далее эти стадии и реализующие их оптические системы будут рассмотрены более подробно с указанием основных процессов, которые определяют выходные параметры источника ионов в целом.

Электронно-оптическая система источника ионов и основные требования к ней

Вопросы эмиссии электронов прямонакальным катодом, формирования электронного пучка и его прохождения через ионизационную камеру является ключевым для понимания механизма последующего формирования пучка ионов. Вопросы эти являются сложными для точного и однозначного решения из-за влияния, часто взаимного, многочисленных и трудно учитываемых факторов. Среди этих факторов важнейшими являются: 1) фокусирующие свойства электронной пушки, образованной катодом, его экраном (электродом Венельта) и передней стенкой ионизационной камеры, 2) условия поддержания стабильного положения электронного пучка в области ионизации продольным для электронов магнитным полем, весьма сложно реализуемые, учитывая небольшую энергию электронов и действие постоянно меняющегося по величине (при настройке отбора ионов) поперечного для электронного пучка электростатического поля в области ионизации и 3) обеспечение регистрации нерассеянных электронов пучка на детектор электронов. Для стабилизации положения области ионизации внутри ионизационной камеры важную роль играет объемный заряд, в области ионизации, создаваемый ионизирующими электронами. Из-за необходимости его ограничения величина электронного тока в области ионизации, по возможности, не должна превышать 200 мкА, что определяет диапазон изменения эмиссии катода. Из тех же соображений ограничения объемного заряда давление анализируемой газовой пробы не должно превышать 10^{-2} Па.

Предварительная схема электронно-оптической системы источника ионов приведена на рис.4. Окончательные параметры этой системы с учетом размеров магнита и действия магнитного поля будут получены на втором этапе работы.

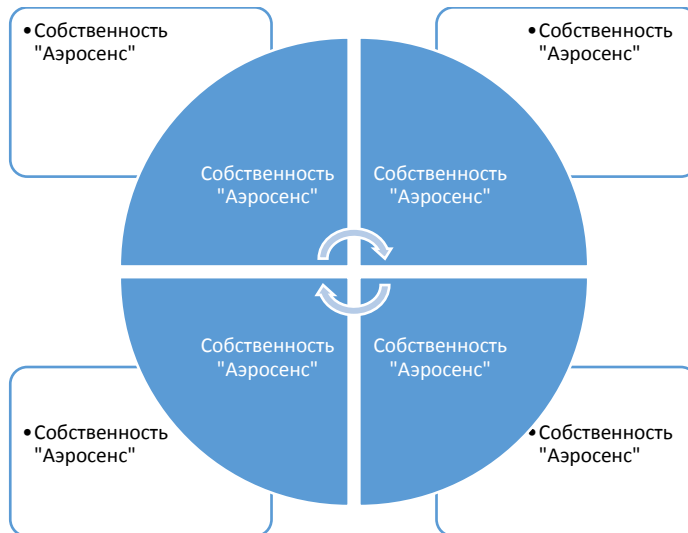


Рис.4. Электронно-оптическая система источника ионов. ВМ – полюсные наконечники магнита источника ионов. Всего в электронной оптике 4 высоковольтных вывода, а $U_{\text{уск}} \equiv V_1$ ионной оптики (рис.7).

При реализации электронно-оптической системы в общей конструкции источника ионов основной сложностью является одновременное обеспечение двух, взаимно противоречивых, требований: обеспечения легкого доступа к блоку прямонакального катода и процедуры его съема для замены перегоревшего катода – основной причины выхода прибора из строя, и обеспечения, при этом, быстрой, точной и воспроизводимой установки блока на место после замены катода. При этом следует иметь в виду, что замена блока катода требует не только полного отключения питания масс-спектрометра, но и его разгерметизации. Конструктивные решения для замены катода с минимальными потерями во времени являются одними из наиболее сложных для масс-спектрометрического приборостроения. Одним из компромиссных решений этой проблемы является использование двух идентичных катодных блоков, каждый из которых может исполнять роль коллектора электронов. Это, по крайней мере, вдвое увеличивает время работы прибора без его остановки и разгерметизации.

Принципы рассмотрения и расчета ионно-оптической системы источника ионов: некоторые сведения из теории транспортировки пучков

Ионно-оптическая система источника ионов с электронной ионизацией является одной из наиболее сложных электронно-оптических проблем, как для физической интерпретации, так и для математического описания. Попытки представить такую систему как набор электронных линз многие десятилетия сдерживал возможности теоретического рассмотрения и

осмысленных расчетов ИОС источника ионов, поскольку результаты таких расчетов ни в коей мере не соответствовали экспериментальным характеристикам источника. Только с переходом к физической модели ИОС источника ионов с электронной ионизацией как к модели иммерсионного объектива с неустойчивым трехмерным катодом и к его математической модели, построенной на основе теории транспортировки пучков, началась новая эра в разработке таких источников, поскольку результаты расчетов стали в значительной мере адекватны экспериментальным результатам.

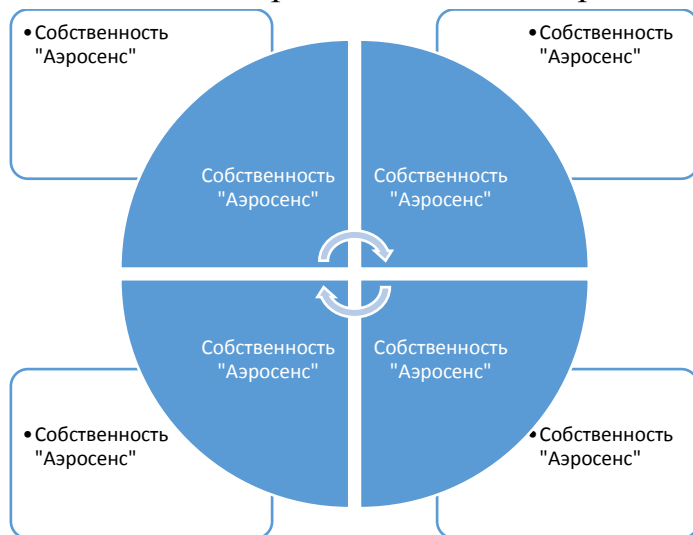


Рис.5. Физическая модель области ионизации источника ионов с электронной ионизацией. «Заполненная» ионами область внутри ионизационной камеры – это идеализированный трехмерный катод (начальный эмиттанс) образующихся при ионизации ионов, далее преобразуемый в ионный пучок при ускорении в направлении оси X.

Теория транспортировки пучков заряженных частиц построена на основе теоретических представлений об их динамике в фазовом пространстве, использующих математический формализм Гамильтона и теорему Лиувилля, широко применяемые в классической статистической механике.

Рассмотрим пучок, состоящий из идентичных частиц, каждая из которых обладает тремя степенями свободы. Движение каждой из этих частиц может быть охарактеризовано изменением положения точки с фазовыми координатами $(q_1, q_2, q_3, p_1, p_2, p_3)$ в шестимерном фазовом пространстве Γ_6 , где q_1, q_2, q_3 – координаты, а p_1, p_2, p_3 – импульсы частицы. При этом гамильтониан каждой частицы, движущейся во внешних полях, будет функцией только этих шести координат и времени, а уравнения движения

$$\text{будут иметь вид: } \begin{cases} \dot{q}_i = \frac{dq_i}{dt} = \frac{\partial H}{\partial p_i} \\ \dot{p}_i = \frac{dp_i}{dt} = -\frac{\partial H}{\partial q_i} \end{cases} \quad i = 1, 2, 3.$$

Состояние всей системы из N частиц в момент времени t характеризуется конфигурацией точек в пространстве Γ_6 , которой соответствует функция плотности f_6 этих точек в фазовом пространстве: $f_6(q_1, q_2, q_3, p_1, p_2, p_3, t) = f_6(\bar{q}, \bar{p}, t)$. При этом частицы занимают в фазовом пространстве объем V_6 , причем число частиц в этом объеме будет $N = \int_{V_6} f_6(\bar{q}, \bar{p}, t) dV_6$.

Для систем, находящихся в стационарном состоянии, функция плотности f_6 явно от времени не зависит, хотя величины \bar{q} и \bar{p} индивидуальных частиц будут зависеть от времени.

К таким системам применима теорема Лиувилля, утверждающая, что фазовый объем V_6 ведет себя как несжимаемая жидкость: $dV_6/dt = 0$. Если движение по каждой из степеней свободы не зависит от двух других, что имеет место в источнике ионов статического масс-спектрометра, то рассмотрение системы существенно упрощается. Вследствие разделения переменных в этом случае

$$\begin{cases} H(\bar{q}, \bar{p}, t) = \sum_{i=1,2,3} H_i(\bar{q}, \bar{p}, t) \\ q_i = \frac{\partial H_i}{\partial p_i}; \quad p_i = \frac{\partial H_i}{\partial q_i} \end{cases}$$

и движение частицы можно представить в трех двухмерных фазовых плоскостях.

Понятие «пучок» всегда ассоциируется с существованием выделенного направления, в котором компонента скорости значительно больше, чем в направлениях, ему перпендикулярных. В источнике ионов таким направлением является направление ускорения ионов (направление по оси X), и движение в этом направлении не связано с действием сил в поперечных (Y, Z) направлениях, что позволяет при расчетах и анализе ионных пучков в источниках ионов применять теорему Лиувилля к проекции шестимерного гиперобъема Γ_6 на поперечное четырехмерное фазовое пространство Γ_4 . Ситуация еще более упрощается в случае, если взаимно поперечные движения частиц в пучке по осям Y и Z тоже независимы (этот вариант реализуется в источниках ионов статических масс-спектрометров). В этом случае математическое описание пучка можно упростить еще больше и описывать его с помощью распределений точек в двух независимых плоскостях в двумерном фазовом пространстве (Y, P_y) и (Z, P_z) .

Объем области, которую занимает пучок в поперечном фазовом пространстве Γ_4 в теории транспортировки пучков называют **эмиттансом** пучка. Ионно-оптическая система, через которую транспортируется пучок,

характеризуется другим четырехмерным объемом – **аксептансом** системы. Аксептанс – это такая фазовая область, все точки которой представляют фазовые координаты частиц, которые будут пропущены через систему. Для пучков с разделенными Y и Z направлениями (анизотропных пучков) фазовая площадь, занимаемая пучком на каждой из плоскостей (Y, P_y) и (Z, P_z) , называется двумерным эмиттансом, и этот эмиттанс, определяемый физическими параметрами ионизации, далее во всех преобразованиях в ИОС источника ионов остается постоянным по площади, изменяя свою форму. При этом нужно учитывать, что для пучков в процессе ускорения, т.е. пучков с изменяющимся продольным импульсом P_x инвариантом будет нормализованный эмиттанс, получаемый домножением начального эмиттанса на корень квадратный из кинетической энергии.

Ясно, что пучок будет проходить без потерь ионно-оптическую систему в том случае, если его эмиттанс будет меньше или равен аксептансу системы. С этой точки зрения основной задачей ионной оптики является такое преобразование формы эмиттанса пучка, чтобы он максимально заполнял аксептанс ионно-оптической системы.

Современные компьютерные программы позволяют с большим уровнем соответствия рассчитывать ионно-оптическую схему и рабочие режимы таких сложных систем, как источники ионов. Но эти программы не «умеют» синтезировать системы. Вариант, пригодный для расчета, обычно составляется на основе имеющихся знаний об аналогичных системах с учетом появившихся к моменту расчета новых требований к источнику ионов, а затем его оптимизация ведется путем перебора вариантов, выявления условий наибольшей чувствительности и сравнения получающегося эмиттанса с заданным при расчете критерием – аксептансом используемого масс-анализатора.

Ионно-оптическая система масс-анализатора

Для реализации спектрографического режима была синтезирована и рассчитана ионно-оптическая схема масс-анализатора с двойной фокусировкой для всех масс (одновременная фокусировка по углу расходимости в горизонтальном направлении и энергии) типа Маттауха – Герцога. При синтезе и расчете схемы учитывались следующие условия:

- желательно, чтобы масс-анализатор вписывался в размер 500x300 мм;
- желательно, чтобы линия фокусов была бы максимально прямой;
- масс-анализатор должен обеспечивать для массы 300 разрешающую способность не менее 300 при ширине щели источника ионов 0,15 мм

энергии ионов 5000В и разбросе ионов по энергии $\pm 1,5$ эВ.

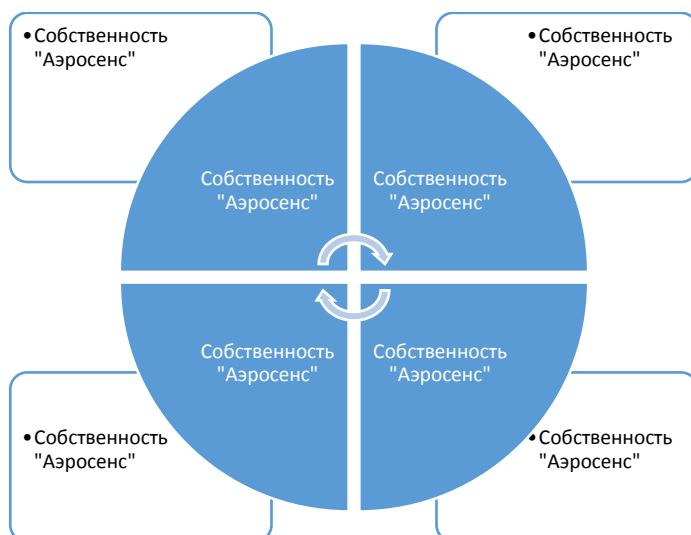


Рис.6. Ионно-оптическая схема масс-спектрографа.

Представленная на рисунке принципиальная схема масс-анализатора рассчитана без учёта реальных краевых полей магнитного сектора и электростатического конденсатора. Учёт влияния краевых полей будет проведен на следующем этапе оптимизации ионно-оптической схемы и, по всей видимости, приведёт к небольшой корректировке угла раствора электростатического сектора φ_E , а также входного и выходного плеч фокусировки L' и L'' , т.е. положения детектирующей плоскости. Кроме того, поскольку все расстояния для величин, связанных с магнитным полем, отсчитываются от положения эффективной границы магнитного поля, вызванной выходящими за пределы полюса краевым магнитным полем, а не от геометрических краёв магнитного сектора, ожидается небольшая корректировка расстояния d между электростатическим конденсатором и магнитным сектором, а также физических границ магнитного сектора (без учёта положения магнитных экранов).

ГЛАВА 3. Сопряжение координатно-чувствительного детектора с портативным статическим масс-спектрографом (работа выполнена Физико-техническим институтом им. А.Ф. Иоффе РАН для ООО «АэроСенс» - малого инновационного предприятия ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России)

В работе проведен расчет схемы масс-спектрографа «S» типа, в котором удаление детектора от выходной границы магнита осуществляется за счет уменьшения секторного угла магнита по сравнению со схемой Маттауха-Герцога и введения угла наклона входной границы магнита относительно нормали к главной ионно-оптической оси схемы. При выборе схемы учтено влияние рассеянного поля магнита, которое увеличивает aberrации схемы при уменьшении секторного угла магнита, из-за уменьшения угла между направлением покидающих магнит ионов и выходной границей магнита. Одна из рассматриваемых авторами настоящей работы ионно-оптических схем масс-спектрографа, рассчитанная с помощью программы SIMION, представлена на рис.7.

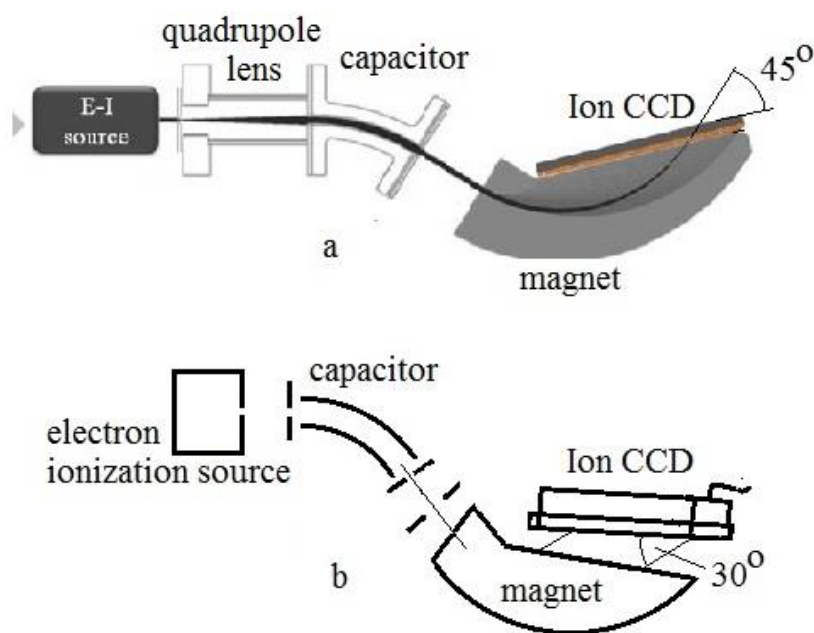


Рис. 7 Сопряжение координатно-чувствительного детектора на основе Ion Charge Coupled Device с портативным статическим масс-спектрографом

На основании расчета выбраны параметры портативного статического инструмента, в котором аналитические характеристики близки к классической схеме Маттауха-Герцога, а линия фокусов отстоит от выходной границы магнита на расстоянии от ~10 mm, для ионов с минимальными радиусами траектории движения в магнитном поле измеряемого диапазона, до ~20 mm, для ионов с максимальными радиусами. Этого расстояния

достаточно, чтобы практически исключить влияние рассеянного магнитного поля на размытие изображения на детекторе. При этом угол наклона линии фокусов масс-спектрографа к направлению движения ионов уменьшается по сравнению со схемой Маттауха-Герцога (45°) и составляет $\sim 30^\circ$.

В настоящей работе проведено сопряжение обсуждаемого масс-спектрографа непосредственно с КЧД, а также экспериментальная проверка эффективности регистрации ионов, падающих под углом (30°) к поверхности детектора. С этой целью, во-первых, измерен масс-спектр компонентов воздушной смеси с помощью регистрирующего каждый ион канального ВЭУ, за счет сканирования диапазона масс изменением энергии ионов, во-вторых, измерен тот же спектр в несканирующем режиме при фиксированной энергии ионов с помощью КЧД (рис.8).

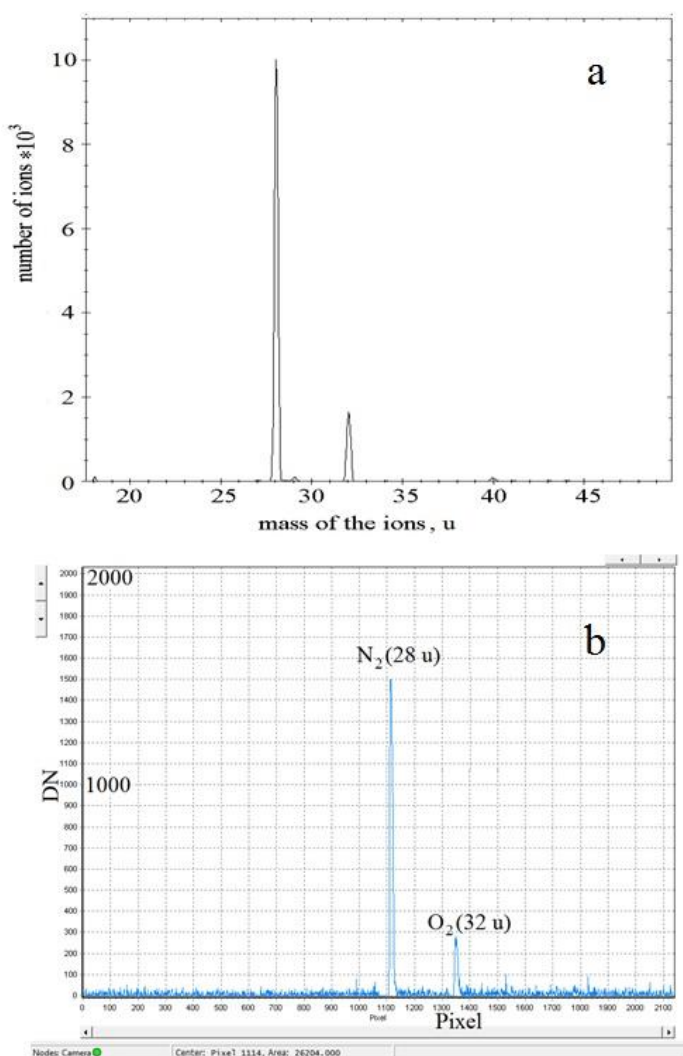


Рис. 8. Сопряжение координатно-чувствительного детектора на основе Ion Charge Coupled Device с портативным статическим масс-спектрографом

Сопоставление данных проводилось по пику азота, измеряемого при

одинаковой энергии ионов, с учетом поправок на различия а) временных интервалов накопления сигнала, б) площадей одновременного сбора ионов для одной точки спектра масс, с) количества напускаемой в источник ионов пробы. Измерения в области максимального значения пика азота, при фиксированной величине ионного тока, показали, что в пределах каждого пикселя ($21 \mu\text{m}$) за время накопления сигнала на КЧД детектор, на один акт регистрации (DN) приходится $160 \text{ ion} \pm 15\%$. При углах наклона между потоком ионов и детектором (45° - 90°), отличающихся от аналогичного угла в рассматриваемом эксперименте (30°), на один акт регистрации приходится $125 \pm 16\%$. Полученные значения свидетельствуют о том, что снижение эффективности регистрации детектора, при уменьшении наклона линии фокусов масс-спектрографа к направлению движения ионов и удалении этой линии от границы магнита, является заметным, но малосущественным.

На рис. 9 представлен спектр криптона, который позволяет оценить разрешающую способность масс-спектрографа.

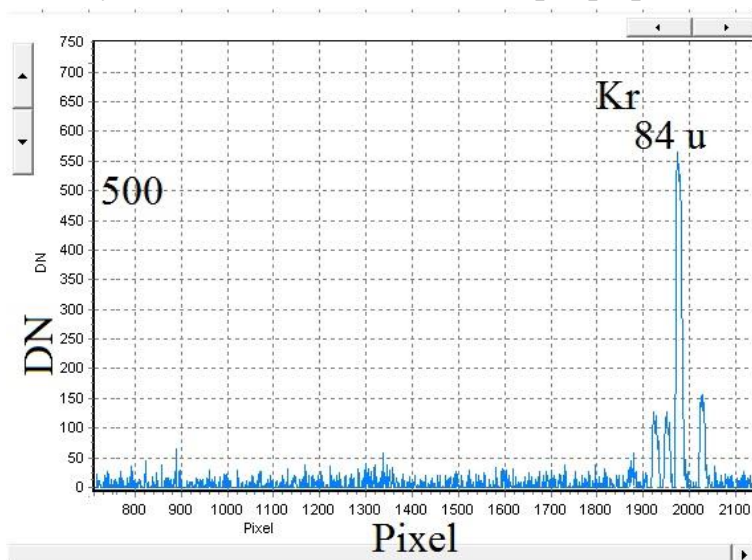


Рис. 9. Сопряжение координатно-чувствительного детектора на основе Ion Charge Coupled Device с портативным статическим масс-спектрографом

Она соответствует величине ~ 150 на уровне 10% и находится на уровне разрешающей способности классической схемы Маттауха-Герцога с близкими геометрическими параметрами (рис.8а).

Полученные результаты эксперимента показывают, что приборы, созданные в соответствии с предложенной схемой масс-спектрографа, могут быть использованы как совместно с КЧД, так и в сочетании с детектором МСР-КЧД, без существенного снижения основных аналитических характеристик инструмента. В первом случае они могут использоваться с источниками ионов, функционирующими в условиях атмосферы, и служить

для анализа нелетучих соединений. Во втором случае, их целесообразно использовать для проведения количественного анализа следов газов, паров и летучих соединений в пробе с помощью источников ионов, расположенных в вакуумной камере.

Заключение

Анализ выдыхаемого воздуха с целью диагностики и мониторинга различных заболеваний имеет большие перспективы и потенциал. Преимуществами данного метода перед традиционно используемыми являются неинвазивность, безопасность, безболезненность, простота исполнения, возможность многократного взятия образцов, быстрота получения результатов анализа, неограниченный контингент обследуемых и отсутствие противопоказаний, дешевизна. Исследования в этом направлении идут относительно давно и даже получены некоторые обнадеживающие результаты, но, тем не менее, широкого применения в медицине данная методика еще не получила. Это связано с 2 основными причинами: техническим несовершенством приборов и отсутствием точных знаний о происхождении многих летучих органических веществ, определяемых в выдыхаемом воздухе. Анализ литературы показал, что разные исследовательские группы используют и разные приборы для выявления летучих органических веществ, которые имеют разную чувствительность, диапазон возможности оценки этих соединений, способы забора анализируемого воздуха, что приводит и к разночтению полученных результатов. Более того, складывается впечатление, что каждая группа продвигает «свой прибор» и методы статистической обработки. Также обращают на себя внимание довольно небольшие группы обследованных как больных, так и здоровых. Поэтому на основании полученных данных, трудно использовать эти результаты для исследования популяций. На основании анализа литературы, для получения объективных данных необходимо стандартизировать методологию, а именно (1 этап):

- должны быть обследованы здоровые люди разного пола, возраста, индекса массы тела, этнической принадлежности для выявления «нормального паттерна» ВВ.

- для чистоты эксперимента необходимо выработать общую методику его проведения с учетом питания, времени суток проведения теста, калибровки окружающей среды, гормонального статуса.

- проба выдыхаемого воздуха, взятого на анализ, должна соответствовать PETS_{CO2}, т.е. важен паттерн дыхания

- должна быть исключена примесь из ротовой полости и окружающей

среды

- тест должен быть воспроизводим.

На 2 этапе должны решаться следующие задачи:

- выявление различий паттерна ВВ у здоровых и больных

- группы должны быть сопоставимы по возрасту и полу

- количество обследованных должно быть достаточным для проведения статистической обработки и выводов

- больные не должны иметь сопутствующей тяжелой патологии, кроме изучаемой, т.к. это может повлиять на результаты исследования

- для подтверждения полученных результатов должно быть проведено исследование *in vitro* у этих же пациентов.

Полученные параметры ИОС масс-анализатора и источника ионов позволяют начать проектирование масс-спектрографа с заданной разрешающей способностью и чувствительностью.

Применение рассматриваемых разновидностей детектора в сочетании с предложенной в работе ионно-оптической схемой позволяет расширить возможности применения масс-спектрометрии, прежде всего, при проведении мониторинга в режиме реального времени в медицине.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 - Buszewski B., Keszy M., Ligor T and Amann A 2007 Human exhaled air analysis biomarkers of diseases *Biomed. Chromatogr.* 21 553-66
- 2 - Di Francesco, R Fuoco, MG Trivella, A Ceccarini - *Microchemical Journal*, 2005 - Elsevier;
- 3 - Libardoni M, Stevens P T, Waite J H and Sacks R 2006 Analysis of human breath samples with a multi-bed sorption trap and comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). *Chromatogr. B* 842 13-21
- 4 - Phillips M 1997 Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath *Anal. Biochem.* 247 272–8
- 5 - Teshima K., Ssugimura H.,Y.Inoue, Takai O., Takano A. 2005 Transparent ultra water-repellent poly(ethylene terephthalate) substrates fabricated by oxygen plasma treatment and subsequent hydrophobic coating - - Elsevier, Volume 244, Issue 1-4, Pages 619–622.
- 6 - Montuschi P, Kharitonov S A and Barnes P J 2001 Exhaled carbon monoxide and nitric oxide in COPD *Chest* 120 496–501
- 7 - M Libardoni, PT Stevens, JH Waite, R Sacks - *Journal of Chromatography B*, 2006 – Elsevier - Volume 842, Issue 1, 14 September 2006, Pages 13–21)
- 8 - Miekisch W, Schubert J K and Noeldge-Schomburg G F 2004 Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds *Clin. Chim. Acta* 347 25–39
- 9 - Ma W, Liu X and Pawliszyn J 2006 Analysis of human breath with micro extraction techniques and continuous monitoring of carbon dioxide concentration *Anal. Bioanal. Chem.* 385 1398–408
- 10 - Deng C, Zhang X and Li N 2004b Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography–mass spectrometry *J Chromatogr B* 808 269–77
- 11 - Mcgrath et.al., 2001
- 12 – Handelman G.J., Rosales L.M., Barbato D., Luscher J., Adhikarla R., Nicolosi R.J., Finkelstein F.O., Ronco C., Kaysen G.A., Hoenich N.A., Levin N.W., Breath ethane in dialysis patients and control subjects, *Free Radical Biology and Medicine* - Volume 35, Issue 1, 1 July 2003, Pages 17–23.
- 13 - Sponring A, Filipiak W, Ager C, Schubert J, Miekisch W, Amann A and Troppmair

- J 2010 Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in the headspace of NCI-H1666 lung cancer cells *Cancer Biomarkers* 7 153–61
- 14** - Phillips M, Cataneo R N, Greenberg J, Grodman R and Salazar M 2003 Breath markers of oxidative stress in patients with unstable angina *Heart Dis.* 5 95–9
- 15** - Aghdassi and Affard, 2000;
- 16** - Phillips et.al., 2000;
- 17** - Moretti et.al., 2004)
- 18** Miekisch W, Schubert J K and Noeldge-Schomburg G F 2004 Diagnostic potential of breath analysis—focus on volatile organic compounds *Clin. Chim. Acta* 347 25–39
- 19** Shin et.al., 1997;
- 20** Turner et. Al., 2006a
- 21** Timmer et.al., 2005
- 22** Abbott et.al., 2003,
- 23** Amann A, Tratnig R and Unterkofler K 2007 Detecting ventricular fibrillation by time-delay methods *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 54 174–7Amann and Smith, 2005,
- 24** - Spinhine et.al., 2003
- 25** - Bioelectronic sniffers for ethanol and acetaldehyde in breath air after drinking Kohji Mitsubayashia,*, Hiroyuki Matsunagab, Genki Nishiob, Satoshi Todab, Yusuke Nakanishib a Department of Biomedical Devices and Instrumentation, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 2-3-10, Japan b Graduate School of Engineering, Tokai University, 1117 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa 259-1292, Japan,
- 26** - Ochiai et.al., 2005
- 27** - Wasserman et.al., 2004
- 28** Khaw B., Narula J. Antibody imaging in the evaluation of cardiovascular disease. *J Nucl Cardiol* 1994: 1:457-76, Moran A., Lipshultz S., Rifai N., et.al. Non-invasive assessment of rejection in pediatric transplant patients: serologic and echocardiographic prediction of biopsy-proven myocardial rejection. *J Heart Lung Transplant* 2000:19:756-64
- 29** Sobotka P., Gupta D., Lansky D., Costanzo M., Zarling E. Breath pentane is a marker of acute cardiac allograft rejection. *J Herat Lung Transplant* 1994;13:224-9. Schimke I., Schikora M., Meyer R., et.al. Oxidative stress in the human heart is associated with

changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Mol Cell Biochem* 2000;204:89-96. Kneepkens C., Ferriera C., Lepage G., Roy C. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* 1992;15:163-86. Kneepkens C., Lepage G., Roy C. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994;17:127-60.

30 Phillips M., Boehmer J., Cataneo R., Cheema T., et.al. Heart Allograft Rejection: detection with breath alkanes in low levels (the Hardball study). *J Heart lung Transplant* 2004;23:701-8.

31 Jordan, A.; Hansel, A.; Holzinger, R.; Lindinger, W. Acetonitrile and benzene in the breath of smokers and non-smokers investigated by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS). *Int. J. Mass Spectrom.* **1995**, *148*, L1–L3. Španěl, P.; Rolfe, P.; Rajant, B.; Smith, D. The selected ion flow tube (SIFT)—A novel technique for biological monitoring. *Ann. Occup. Hyg.* **1996**, *40*, 615–626. Abbott, S.M.; Elder, J.B.; Španěl, P.; Smith, D. Quantification of acetonitrile in exhaled breath and urinary headspace using selected ion flow tube mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *228*, 655–665

32 Buszewski, B.; Ulanowska, A.; Ligor, T.; Denderz, N.; Amann, A. Analysis of exhaled breath from smokers, passive smokers and non-smokers by solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **2009**, *23*, 551–556. Prazeller, P.; Karl, T.; Jordan, A.; Holzinger, R.; Hansel, A.; Lindinger, W. Quantification of passive smoking using proton-transfer-reaction mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **1998**, *178*, L1–L4.

33 Sandberg, A.; Skold, C.M.; Grunewald, J. ; Eklund, A.; Wheelock, A.M. Assessing recent smoking status by measuring exhaled carbon monoxide levels. *PLoS One* **2011**, *6*, 1–7.

34 Syhre, M.,Manning, L.; Phuanukoonnon, S.; Harino, P.; Chambers, S.T. The scent of Mycobacterium tuberculosis–Part II breath. *Tuberculosis* **2009**, *89*, 263–266

35 Tisdall P., Roberts G., Anhalt J. Identification of clinical isolates of Mycobacteria with gas-liquid chromatography alone. *J Clin Microbiol* 1979;10;506-14. Zhang Y., Zhuang Y., Liu Z., RuanJ. Identification of twenty-eight species Mycobacteria with their cellular fatty acids by capillary gas chromatography. *Wei Sheng Wu Xue Bao*

1991;31:187-97. Perez J., Fauville-Dufaux M., Dossogne J. et.al. Faster identification of micobacteria using gas liquid and thin layer chromatography. *Eur J Clin Microbiol infect Dis* 1994;13;717-25

36 Phillips M., Cataneo R., Condos R., Frickson G., et. al. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* 2007;87:44-52

37 Phillips M., Basa-Dalay V., Bothamley G., Cataneo R., et. al. Breath biomarkers of active pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2010;90:145-151

40 Sung H J and Cho J Y 2008 Biomarkers for the lung cancer diagnosis and their advances in proteomics *BMB Rep.***41** 615—25

41 Bonassi S, Neri M and Puntoni R 2001 Validation of biomarkers as early predictors of disease *Mutat. Res.* **480–481** 349–58, Rifai N, Gillette M A and Carr S A 2006 Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility *Nat. Biotechnol.* **24** 971–83

42 Nedelkov D, Kiernan U A, Niederkofler E E, Tubbs K A and Nelson R W 2005 Investigating diversity in human plasma proteins *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102** 10852–7

43 Mazzone P., Hammel J., Dweik R., Na J., et. al. Diagnosis of lung cancer by analysis of exhaled breath with a colorimetric sensor array. *Thorax* 2007;62:565-568

44 Ligor M., Ligor T., Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., et. al. Determination of volatile organic compaunds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass scectrometry. *Clin Lab Med* 2009;47:550-560

45 Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Kleiber M., et.al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer* 2009;9:348)

46 Ulanowska A., Kowalkowski T., Trawinska E., Buszewski B. The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer. *J. Breath Res.* 5.2011

47 Dragonieri S., Annema J., Schot R., Van der Schee M., et.al. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung cancer* 64 (2009);166-170

48 Qin T., Song Q., WangH., Pan Y., et. Al. The screening of Volatile markers for hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;19(9);2247-53,2010

49 137, Terner

51 Phillips M., Cataneo R., Ditkoff B., Fisher P., et. al. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. *Breast Cancer research and treatment* 2006;99:19-21

Двухмембранная система ввода пробы в масс-спектрометр для исследования выдыхаемого воздуха

© В. Коган,¹ А.С. Антонов,¹ Ю.В. Чичагов,¹ О.С. Викторова-Леклерк,¹ И.В. Викторов,¹ А.В. Козленок²

¹ Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, 194021 Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный медицинский исследовательский центр им. Алмазова, 197341 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: Viktor.Kogan@mail.ioffe.ru, vtkogan@hotmail.com

(Поступило в Редакцию 1 июня 2017 г. В окончательной редакции 19 февраля 2018 г.)

Описана двухмембранная система ввода пробы, позволяющая проводить масс-спектрометрическое определение летучих органических соединений в воздухе, обеспечивая при этом пределы их обнаружения от долей миллиардной части состава пробы (долей ppb) в режиме реального времени с задержкой отклика от единиц до десятков секунд. Она включает два мембранных интерфейса, разделенных объемом, давление газа в котором поддерживается через канал с регулируемым сечением откачки. Представлены результаты численного моделирования и экспериментальной проверки системы. Описана методика выбора и расчета параметров системы. Обсуждена возможность применения рассмотренной системы для диагностики заболеваний по следовым количествам биомаркеров в выдыхаемом воздухе.

DOI: 10.21883/JTF.2018.10.46507.2372

Введение

Достижение низких пределов обнаружения (от долей ppb) летучих органических соединений в воздушных пробах при изучении динамики процессов с характерными временами секунды и менее, например, диагностика заболеваний по составу выдыхаемого воздуха, наилучшим образом осуществляется инструментами Proton Transfer Reaction Mass-Spectrometry (PTR-MS) [1] и Selected Ion Flow Tube Mass-Spectrometry (SIFT-MS) [2]. Линейки таких инструментов включают приборы с разными возможностями и позволяют достигать пределов определения на уровне ppt [3–6], но все они отличаются сложностью процедуры измерения и дороговизной. В то же время по своим возможностям к ним приближается более простой метод масс-спектрометрии с использованием мембранных интерфейсов (Membrane Introduction Mass Spectrometry, MIMS) [7,8]. За счет избирательной проницаемости используемых мембран MIMS позволяет добиваться высокой чувствительности для значительной группы целевых соединений. В процессе введения пробы в прибор происходит обогащение воздушной пробы целевыми соединениями до тысяч раз [9]. Тем не менее применение одиночного мембранного интерфейса часто оказывается недостаточным для достижения требуемых характеристик инструмента. Так, в медицине при проведении ранней диагностики заболеваний по составу выдыхаемого воздуха, предел определения биомаркеров должен находиться на уровне долей ppb.

В работах [10–12] показана принципиальная возможность применения многомембранных систем ввода для увеличения эффекта относительного обогащения пробы целевыми соединениями в процессе подачи ее в масс-спектрометр. Однако в этих работах не определены требования к параметрам многомембранных систем и к

режиму ввода пробы, которые позволили бы перейти от относительного обогащения пробы к понижению предела обнаружения целевых соединений за счет введения дополнительной мембраны в систему ввода. Кроме того, в этих работах не рассматриваются вопросы влияния параметров системы ввода на задержку отклика прибора после изменения состава пробы, что важно при изучении динамики изучаемых процессов. В настоящей работе предпринята попытка обосновать выбор параметров, обеспечивающих максимальное обогащение и быстроедействие двухмембранной системы ввода пробы левелиновского типа [13] для большой группы целевых соединений.

1. Приборы и материалы

В работе использован портативный масс-спектрометр с двойной фокусировкой, описанный в [14]. В качестве мембранного материала в работе использовались мембраны: SSP-M100, Specialty Silicone Products Inc., Ballston Spa, NY толщиной 100 μm и мембраны фирмы DOW Corning толщиной 59 μm .

2. Поток летучих соединений через двухмембранную систему

Оригинальная система ввода пробы представлена на рис. 1. Рассмотрение ее работы в квазистатическом режиме, обеспечивающем максимальное относительное обогащение пробы соединением j , для которого $\sigma_j = \sigma_{j\text{max}}$, целесообразно рассматривать раздельно для основного компонента воздушной пробы — азота, принимая упрощение $\sigma_\alpha = \sigma_{\text{Nitrogen}}$, и целевого соединения j