



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.08.085>

УДК 543:05

І. Б. Захарків, М. Ф. Зуй

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: marynazui3@gmail.com

Твердофазна мікроекстракція аліфатичних альдегідів C_5-C_8 з подальшим газохроматографічним визначенням для діагностики раку легень

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. С. Слободяником)

*Розроблено чутливу методу парофазного твердофазного мікроекстракційного концентрування аліфатичних альдегідів C_5-C_8 з водних розчинів у формі похідних *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламіну з подальшим газохроматографічним визначенням з полуменево-іонізаційним детектором. Як покриття для вилучення використано комерційне волокно з полідиметилсилоксану-дивінілбензолу. В оптимальних умовах досягнуті високі значення коефіцієнтів концентрування аналітів, які становлять 7280–8650, а межа виявлення альдегідів дорівнює 0,016–0,020 мкмоль/л.*

Ключові слова: твердофазна мікроекстракція, аліфатичні альдегіди, дериватизація, *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламін гідрохлорид, газова хроматографія.

Рак легень є найпоширенішою причиною смертності при онкозахворюваннях у світі. Існує значна кількість експериментальних досліджень, які свідчать про наявність летких речовин у повітрі, що видихається людиною, хворою на рак легень [1]. Деякі вчені встановили наявність 22 летких органічних сполук у такому повітрі, включаючи альдегіди гексаналь та гептаналь, які можна використовувати як маркери раку легень. При дослідженні вмісту гептаналу та гексаналу в крові із застосуванням дискримінантного аналізу дослідники змогли визначити 71,7% онкохворих і 66,7% здорових людей в перехресному дослідженні, у якому брали участь 108 осіб високого ризику [2]. Загалом, у видихуваному повітрі онкологічних хворих виявлено підвищені концентрації пентаналу, гексаналу, гептаналу та октаналу порівняно зі здоровими добровольцями і курцями [1]. Встановлено, що гексаналь і гептаналь утворюються в ракових клітинах самі по собі, звідки переходять у кров і далі

© І. Б. Захарків, М. Ф. Зуй, 2016

внаслідок дифузії потрапляють у дихальні шляхи [3]. Високий рівень цих альдегідів у крові (більше 1,8 мкмоль/л) знайдено лише у хворих на рак легенів, тоді як у здорових людей їх вміст є значно меншим (близько 0,2 мкмоль/л) [4].

Пряме хроматографічне визначення альдегідів у плазмі крові є досить складною задачею через їх високу полярність, леткість і невеликий розмір молекул. Тому при пробопідготовці необхідне використання реакції дериватизації — переведення сполук у похідні з кращими аналітичними характеристиками: меншою полярністю, більшою молекулярною масою, вищою гідрофобністю. Крім того, через складність матриці досліджуваного зразка і низькі концентрації альдегідів у крові для поліпшення чутливості методу необхідно провести виділення і концентрування сполук [5]. Для вилучення альдегідів перед їх хроматографічним визначенням розроблено різні екстракційні методи з попередньою дериватизацією. На сьогодні для дериватизації карбонільних сполук у поєднанні з газовою хроматографією (ГХ) найбільш широко використовується *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламін (ПФБГА), який є універсальним реагентом для цього класу сполук [6]. Цей метод дериватизації альдегідів запропоновано Агентством з охорони навколишнього середовища США і Американською асоціацією охорони здоров'я для ГХ визначення альдегідів після рідинної екстракції гексаном з електронно-захоплюючим детектором (ЕРА Method 556) [7]. Проте метод рідинної екстракції альдегідів є екологічно небезпечним, оскільки при цьому використовують відносно великі кількості органічних розчинників, а також метод характеризується низькими коефіцієнтами концентрування.

Сучасними тенденціями пробопідготовки в аналітичній хімії є мініатюризація, спрощення аналітичної процедури, мінімізація споживання реагентів і вартості аналізу, досягнення при цьому високих значень коефіцієнтів концентрування. Одним з методів, що відповідає таким вимогам, є твердофазна мікроекстракція (ТФМЕ), яка на сьогодні знаходить широке застосування в аналітичній хімії і добре поєднується з методом ГХ [8].

У програмі EPI Suite розраховані значення коефіцієнта ліпофільності ($\log P$) і константи Генрі (K_H) для похідних аліфатичних альдегідів C_5 – C_8 з ПФБГА (табл. 1).

Одержані значення константи Генрі вказують на те, що розглянуті похідні належать до легких сполук, тому перспективним для них є парофазне вилучення, яке мінімізує забруднення і пошкодження ТФМЕ-покриття.

Отже, нашою метою є розробка методики парофазного ТФМЕ-концентрування аліфатичних альдегідів C_5 – C_8 у формі ПФБГА похідних з водних розчинів (модельних розчинів сироватки крові) з подальшим ГХ визначенням з полуменево-іонізаційним детектором.

Використовували пентаналь, гептаналь, гексаналь і октаналь фірми “Sigma Aldrich”, *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гідроксиламін гідрохлорид фірми “Fluka”, комерційне волокно для ТФМЕ з полідиметилсилоксану-дивінілбензолу (ПДМС-ДВБ) фірми “Supelco” (об’єм волокна 0,44 мкл).

Таблиця 1. Результати розрахунку коефіцієнтів ліпофільності і констант Генрі для похідних аліфатичних альдегідів C_5 – C_8 з ПФБГА в програмі EPI Suite

Похідні альдегідів	$\log P$	$K_H \cdot 10^3$, атм · м ³ /моль (25 °С)
ПФБГА– C_5	4,10	0,77
ПФБГА– C_6	4,59	1,0
ПФБГА– C_7	5,08	1,4
ПФБГА– C_8	5,58	1,8

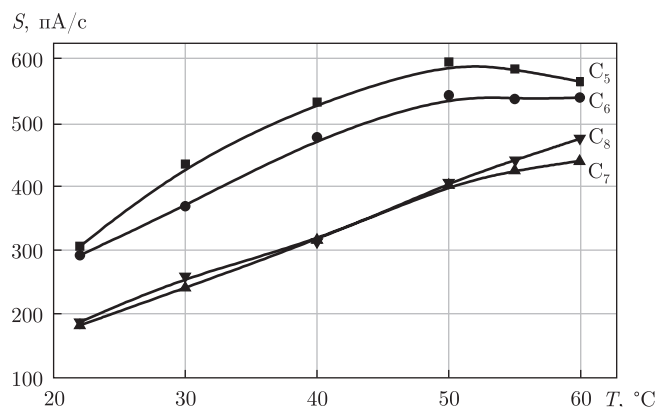


Рис. 1. Залежність аналітичного сигналу дериватів альдегідів від температури проведення ТФМЕ

Визначення проводили на газовому хроматографі Agilent Technologies 6890N за таких умов: капілярна колонка HP-5, 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; швидкість потоку газу — носія гелію 2,5 мл/хв; температурна програма печі 50 °C (1 хв), 50–150 °C (10 °C/хв), 150–300 °C (20 °C/хв), 300 °C (5 хв); температура випарника 250 °C; режим без поділу потоку splitless, температура детектора 300 °C.

У цьому варіанті ТФМЕ спочатку проводять дериватизацію альдегідів у розчині за допомогою ПФБГА, після чого парофазно вилучають утворені деривати. Процес дериватизації проходить досить швидко, кількісно, і 30 хв достатньо для повного завершення реакції перетворення альдегідів C₅–C₈ у відповідні оксими. Дослідження показали, що вилучення дериватів найкраще проходить у діапазоні рН 4,0–8,0.

Температура є основним параметром у парофазному вилученні. З одного боку, її підвищення прискорює перенесення речовин у парову фазу за рахунок збільшення коефіцієнта дифузії та константи Генрі, з іншого — погіршує сорбцію внаслідок збільшення тиску насиченої пари. Таким чином, важливо вибрати оптимальну температуру сорбції, яка враховує легкість аналітів та їх сорбційні властивості. З рис. 1 можна побачити, що максимальний аналітичний сигнал для альдегідів C₅ і C₆ досягається при 50 °C. При подальшому підвищенні температури ефективність вилучення похідного альдегіду C₈ покращується, C₇ — незначною мірою покращується, C₆ — не змінюється, C₅ — незначно погіршується, що має прямий зв'язок з легкістю і температурою кипіння дериватів. Тому оптимальною вважали температуру 50 °C.

Можна відзначити: при дериватизації в розчині аналітичні сигнали альдегідів зменшуються від C₅ до C₇, C₈. Це може бути пов'язано з частковим розмиванням (або сорбцією) утворених дериватів на внутрішній поверхні віали, що контактує з водним розчином, оскільки зі збільшенням алкільного радикала підвищуються значення $\log P$ та зменшується розчинність дериватів у воді. Це перешкоджає масопереносу похідних альдегідів у парову фазу, незважаючи на те, що константа Генрі зі збільшенням алкільного радикала збільшується. Для того щоб з'ясувати, як запобігти цьому процесу, було досліджено вплив полярного апротонного органічного розчинника ацетонітрилу на ефективність ТФМЕ. Як видно з рис. 2, якщо вміст розчинника становить 4%, спостерігаються максимальні сигнали для більшості альдегідів. З підвищенням вмісту ацетонітрилу аналітичний сигнал альдегіду C₅ зменшується за рахунок збільшення розчинності у воді. Для альдегідів C₇, C₈ при збільшенні вмісту ацетонітрилу до 4% аналітичний сигнал зростає за рахунок незначного підвищення

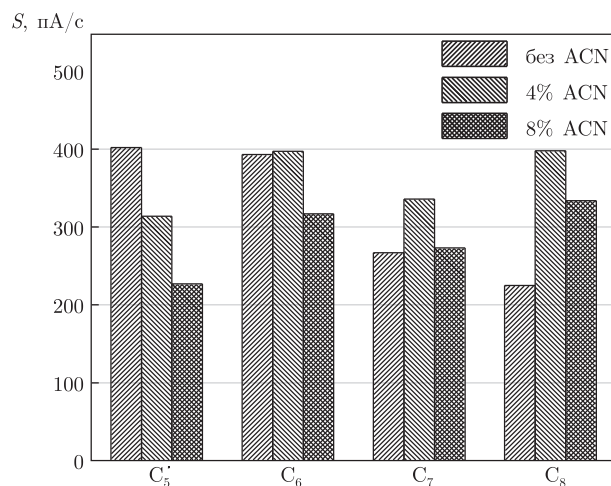


Рис. 2. Залежність аналітичного сигналу дериватів альдегідів від вмісту ацетонітрилу (ACN)

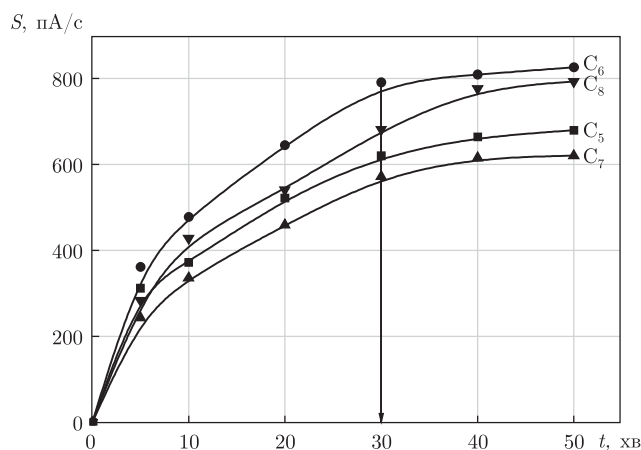


Рис. 3. Залежність аналітичного сигналу дериватів альдегідів від часу ТФМЕ

розчинності дериватів, що запобігає їх розмиванню, а при досягненні вмісту розчинника 8% через надмірне збільшення розчинності дериватів площа піків зменшується. Треба зазначити, що у разі вмісту ацетонітрилу 4% аналітичні сигнали альдегідів C₆ і C₈ вирівнюються. Таким чином, цей вміст розчинника є оптимальним для запобігання розмиванню похідних альдегідів C₅–C₈ та досягнення кращих аналітичних сигналів сполук.

Встановлено, що оптимальний час проведення мікроекстракції дериватів дорівнює 30 хв, при цьому для альдегідів C₅–C₇ практично досягається екстракційна рівновага, для похідного альдегіду C₈ потрібно трохи більше часу — 40 хв (рис. 3).

Об'єм зразка також є важливим параметром, що впливає на ефективність ТФМЕ. У парофазній ТФМЕ аналіт розподіляється між трьома фазами — водним розчином проби, паровою фазою і сорбентом. У цьому випадку ефективність вилучення залежить також від об'єму парової фази. Він повинен бути якомога меншим, щоб уникнути надмірного розбавлення аналітів у цій фазі, оскільки це істотно впливає на чутливість методики. Зі збільшенням об'єму водної проби аналітичний сигнал дериватів зростає, оскільки кількість альдегідів, що вводиться в систему, пропорційна об'єму водного розчину сполуки (рис. 4).

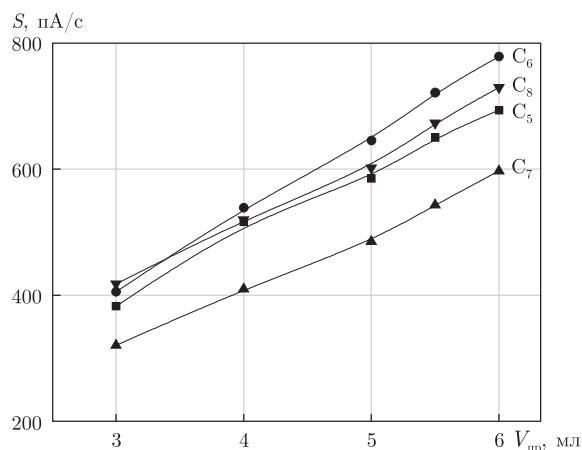


Рис. 4. Залежність аналітичного сигналу дериватів альдегідів від об'єму проби

Зручною кількістю для проведення ТФМЕ є 5,5 мл водного розчину при загальному об'ємі віали 10 мл.

У табл. 2 наведено кількісні характеристики двох розроблених методів ТФМЕ вилучення альдегідів. На основі високих досягнутих значень ступенів вилучення (R , %) та коефіцієнтів концентрування (K) аліфатичних альдегідів у формі ПФБГА дериватів можна зробити висновок, що метод ТФМЕ є досить ефективним для виділення і концентрування досліджуваних сполук.

Для ГХ визначення аліфатичних альдегідів C_5 – C_8 після дериватизації з ПФБГА і ТФМЕ були побудовані градувальні графіки в лінійному діапазоні концентрацій 0,05–0,40 мкмоль/л та розраховані межі виявлення за 3 σ -критерієм для кожного альдегіду (табл. 3). Отримані дані свідчать про достатньо високу чутливість та селективність запропонованої методики.

Таким чином, розроблена методика є перспективною для визначення аліфатичних альдегідів C_5 – C_8 у біологічних рідинах на рівні, що дає змогу діагностувати рак легенів.

Таблиця 2. Кількісні характеристики (ступінь вилучення та коефіцієнт концентрування) твердофазної мікроекстракції альдегідів C_5 – C_8

Альдегід	R , %	K
Пентаналь	58	7280
Гексаналь	67	8360
Гептаналь	69	8650
Октаналь	58	7280

Таблиця 3. Характеристики градувальних графіків для визначення альдегідів C_5 – C_8 у формі ПФБГА-похідних після ТФМЕ з дериватизацією в розчині

Аналітична форма	Рівняння градувального графіка	Межа виявлення, мкмоль/л	r^2
ПФБГА– C_5	$S = (3 \pm 3) \cdot 10 + (62 \pm 1) \cdot 100 \cdot C$	0,017	0,997
ПФБГА– C_6	$S = (2 \pm 4) \cdot 10 + (71 \pm 2) \cdot 100 \cdot C$	0,018	0,996
ПФБГА– C_7	$S = (0 \pm 4) \cdot 10 + (56 \pm 2) \cdot 100 \cdot C$	0,020	0,995
ПФБГА– C_8	$S = (0 \pm 4) \cdot 10 + (69 \pm 2) \cdot 100 \cdot C$	0,016	0,997

Цитована література

1. *Fuchs P., Loesecken C., Schubert J., Miekisch W.* Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer // *Int. J. Cancer.* – 2009. – **126**. – P. 2663–2670.
2. *Phillips M., Gleeson K., Hughes M., Greenberg J., Cataneo R., Baker L., McVay P.* Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study // *Lancet.* – 1999. – **353**. – P. 1930–1933.
3. *Deng C., Zhang X., Li N.* Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry // *J. Chromatogr. B.* – 2004. – **808**. – P. 269–277.
4. *Hakim M., Broza Y., Barash O., Peled N., Phillips M., Amann A., Haick H.* Volatile Organic Compounds of Lung Cancer and Possible Biochemical Pathways // *Chem. Rev.* – 2012. – **112**, No 11. – P. 5949–5966.
5. *Xu H., Lv L., Hu S., Song D.* High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization // *J. Chromatogr. A.* – 2010. – **1217**. – P. 2371–2375.
6. *Cancilla D., Que Hee S.* *O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds // *J. Chromatogr.* – 1992. – **627**. – P. 1–16.
7. *Method 556: Determination of carbonyl compounds in drinking water by pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and capillary gas chromatography with electron capture detection* / National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development. – Cincinnati, Ohio, 1998. – P. 1–37.
8. *Зайцев В. Н., Зуй М. Ф.* Твердофазное микроэкстракционное концентрирование // *Журн. аналит. химии.* – 2014. – **69**, № 8. – P. 787–800.

References

1. *Fuchs P., Loesecken C., Schubert J., Miekisch W.* *Int. J. Cancer*, 2009, **126**: 2663–2670.
2. *Phillips M., Gleeson K., Hughes M., Greenberg J., Cataneo R., Baker L., McVay P.* *Lancet*, 1999, **353**: 1930–1933.
3. *Deng C., Zhang X., Li N.* *J. Chromatogr. B*, 2004, **808**: 269–277.
4. *Hakim M., Broza Y., Barash O., Peled N., Phillips M., Amann A., Haick H.* *Chem. Rev.*, 2012, **112**, No 11: 5949–5966.
5. *Xu H., Lv L., Hu S., Song D.* *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**: 2371–2375.
6. *Cancilla D., Que Hee S.* *J. Chromatogr.*, 1992, **627**: 1–16.
7. *Method 556: Determination of carbonyl compounds in drinking water by pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and capillary gas chromatography with electron capture detection*, National Exposure Research Laboratory. Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268. 1998, 1–37.
8. *Zaitsev V. N., Zui M. F.* *J. Anal., Chem.*, 2014, **69**, No 8: 787–800 (in Russian).

Надійшло до редакції 09.12.2015

И. Б. Захаркив, М. Ф. Зуй

Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка
E-mail: marynazui3@gmail.com

Твердофазная микроэкстракция алифатических альдегидов C₅–C₈ с последующим газохроматографическим определением для диагностики рака легких

Разработана чувствительная методика парофазного твердофазного микроэкстракционного концентрирования алифатических альдегидов C₅–C₈ из водных растворов в форме производных *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламина с последующим газохроматографическим

определением с пламенно-ионизационным детектором. В качестве покрытия для извлечения использовано коммерческое волокно из полидиметилсилоксана-дивинилбензола. В оптимальных условиях достигнуты достаточно высокие значения коэффициентов концентрирования аналитов, которые составляют 7280–8650, а пределы обнаружения альдегидов — 0,016–0,020 мкмоль/л.

Ключевые слова: твердофазная микроэкстракция, алифатические альдегиды, дериватизация, *o*-(2,3,4,5,6-пентафторбензил)гидроксиламин гидрохлорид, газовая хроматография.

I. V. Zakharkiv, M. F. Zui

Taras Shevchenko National University of Kiev

E-mail: marynazui3@gmail.com

Solid-phase microextraction of aliphatic aldehydes C₅–C₈ and gas chromatographic determination for lung cancer diagnosis

*A headspace solid-phase microextraction procedure followed by gas chromatography with flame ionization detection has been developed for the preconcentration and the determination of aliphatic aldehydes C₅–C₈ in the form of its *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives in water samples. Commercial polydimethylsiloxane-divinylbenzene fiber was used as a preconcentration coating. Under optimal conditions, the enrichment factors of analytes were in the range 7280–8650, and the limits of detection were 0.016–0.020 μM/L.*

Keywords: solid phase microextraction, aliphatic aldehydes, derivatization, *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride, gas chromatography.