

Масс-спектрометрические исследования состава газовой выделения живых организмов

© А.Г. Кузьмин,¹ Ю.А. Титов,¹ Г.В. Митина²

¹ Институт аналитического приборостроения РАН,
190103 Санкт-Петербург, Россия

² Всероссийский институт защиты растений,
196608 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: top1m@mail.ru

Поступило в Редакцию 30 декабря 2021 г.

В окончательной редакции 30 декабря 2021 г.

Принято к публикации 1 марта 2022 г.

С помощью квадрупольного масс-спектрометра изучен количественный и качественный состав летучих органических соединений (ЛОС), выделяемых в воздушную среду различными биологическими объектами, среди которых человек, энтомопатогенные грибы (ЭГ) рода *Lecanicillium*, гусеницы капустной совки *Mamestra brassicae*, имаго хищного клопа *Podisus maculiventris*. Основными обнаруженными компонентами у всех протестированных объектов были ацетон, уксусная кислота, изопрен. Эти компоненты в выдохе человека являются значимыми показателями для неинвазивной диагностики заболеваний. В составе ЛОС ЭГ впервые обнаружен диоксид серы, который может влиять на поведение насекомых. В воздушной среде гусениц капустной совки обнаружена исключительно уксусная кислота.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, анализ летучих органических соединений, выдыхаемый воздух, энтомопатогенные грибы, *Mamestra brassicae* L., *Podisus maculiventris* S.

DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52653.341-21

Введение

Известно, что в живых организмах непрерывно происходят химические реакции обмена веществ, в результате которых синтезируются в нужных количествах необходимые для жизнедеятельности продукты. При этом также образуются определенные продукты метаболизма — летучие органические соединения (ЛОС). Эти продукты выделяются в процессе дыхания и у животных (в том числе у человека) и у растений. Определение состава газов, выделяемых живым организмом, позволяет делать заключения о том, какие обменные процессы являются преобладающими, производить диагностику состояния организма, а также отслеживать их реакцию на различные внешние воздействия.

Вопрос изучения состава воздуха, выдыхаемого человеком, широко освещается в литературе. Этому вопросу посвящены многочисленные обзоры [1–5]. Основными физическими методами анализа состава выдыхаемого воздуха являются: хроматография [6,7], хроматомасс-спектрометрия [8,9], электрохимические сенсоры [10], лазерная оптическая спектроскопия [11] и диодная лазерная спектроскопия [12]. Однако все перечисленные методы имеют существенные недостатки, которые до сих пор не позволили разработать и вывести на медицинский рынок ни одного серийного инструмента, отвечающего всем требованиям медицинской диагностики. Можно отметить основные недостатки перечисленных методов. Для хроматографии и хроматомасс-спектрометрии требуется сложная и трудоемкая процедура пробоподготов-

ки с концентрированием проб выдыхаемого воздуха на сорбентах и с последующей термодесорбцией в системе ввода хроматографа. Процедура одного такого анализа занимает не менее 30 min. Электрохимические сенсоры являются селективными датчиками, предназначенными для анализа только одной компоненты смеси. Они очень критичны к повышенной влажности, которая имеет место в выдыхаемом воздухе, имеют низкое быстродействие (десятки секунд) и требуют дополнительного времени для восстановления рабочего состояния датчика после анализа. Лазерная спектроскопия настраивается на регистрацию только отдельных компонентов, т.е. является селективным методом, и требует использования дополнительных многопроходных кювет для реализации оптического пути в несколько десятков метров.

Таким образом, существует потребность в разработке полиселективного метода анализа состава воздуха, выделяемого человеком и другими живыми организмами, который при высокой чувствительности имеет возможность анализировать одновременно все компоненты сложных газовых смесей с высокой чувствительностью и быстродействием в режиме реального времени. Оптимальным методом для высокочувствительного анализа состава ЛОС является масс-спектрометрия.

1. Эксперимент

Для изучения количественного и качественного составов основных ЛОС, выделяемых живыми организмами,

применялся метод прямого газового масс-спектрометрического анализа. В качестве анализатора использовался разработанный в Институте аналитического приборостроения РАН малогабаритный переносной квадрупольный масс-спектрометр с прямым капиллярным вводом пробы при атмосферном давлении и ионизацией электронным ударом — MC7-200, который нашел широкое применение для анализа состава выдыхаемого человеком и животными воздуха, а также состава различных газовых сред [13–16]. Масс-спектрометр позволяет производить анализ ЛОС в диапазоне массовых чисел 1–200 a.m.u., имеет разрешающую способность 1 a.m.u., чувствительность по отдельным компонентам 50–500 ppb. Ввод пробы осуществляется непосредственно из атмосферы через прогреваемый до 50°C капилляр длиной 3 м. Расход пробы составляет 5–8 μl/s. Вес прибора 13 kg.

В качестве объектов исследования были использованы:

— выдыхаемый ртом воздух авторов настоящей работы, отбираемый капилляром масс-спектрометра неинвазивно около рта;

— воздушная среда энтомопатогенных грибов (ЭГ) рода *Lecanicillium*, применяемых в качестве продуцентов экологически безопасных биопрепаратов для защиты растений от вредителей, и выращенных на питательной среде в стеклянных хроматографических виалах емкостью 20 ml;

— воздушная среда из садка с разводимыми там гусеницами капустной совки *Mamestra brassicae* L.;

— воздушная среда из садка с хищными клопами из семейства щитников *Podisus maculiventris* S.

Регистрация и обработка масс-спектров производилась в режиме реального времени.

2. Результаты

2.1. Выдыхаемый воздух человека

Характерный масс-спектр выдоха участников экспериментов представлен на рис. 1.

Состав выдыхаемого воздуха, как правило, содержит три основных компонента: ацетон — C₃H₆O (масса 58),

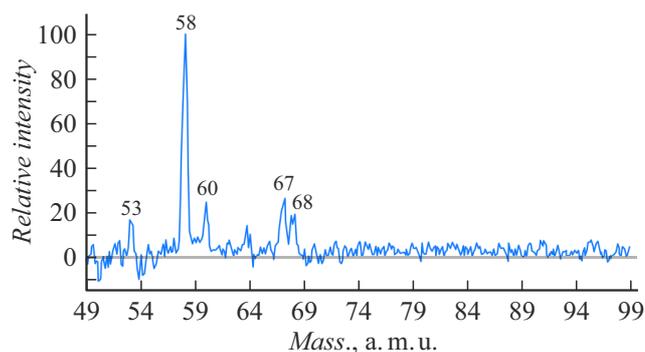


Рис. 1. Масс-спектр выдыхаемого человеком воздуха.

уксусная кислота — CH₃COOH (масса 60), изопрен — C₅H₈ (массы 53, 67, 68). Концентрации указанных компонент лежат в диапазоне 0.05–0.2 ppb. Содержание указанных компонент варьировалось в некоторых пределах ±20–30% в зависимости от состояния человека и от его индивидуальных особенностей. Указанные компоненты являются значимыми для неинвазивной диагностики заболеваний у человека. Это было отмечено в ряде публикаций зарубежных авторов [17,18]. Однако следует отметить, что для получения этих данных использовались масс-спектрометры типа SIFT-MS, стоимость которых более чем на порядок превышает MC7-200 и которые являются очень громоздкими (вес 150 kg). Таким образом, масс-спектрометр MC7-200 при малых габаритах и небольшой стоимости обладает достаточной чувствительностью для получения диагностически значимых данных по составу выдыхаемого воздуха.

2.2. Энтомопатогенные грибы

ЭГ применяются в качестве средств микробиологической защиты растений и являются необходимой альтернативой химическим инсектицидам, в связи с развитием резистентности фитофагов к инсектицидам и негативным влиянием остаточных количеств инсектицидов на окружающую среду и здоровье человека. Сведения о составе ЛОС энтомопатогенных грибов и их влиянии на членистоногих по данным литературы весьма ограничены. Поэтому углубленное изучение состава ЛОС позволит оценивать свойства различных штаммов ЭГ, влияющих на поведение насекомых.

Масс-спектры воздушной среды ЭГ рода *Lecanicillium* показали большое разнообразие. Благодаря этому разнообразию мицелий ЭГ вызывал различные поведенческие реакции у насекомых: от репеллентности до аттрактивности [19]. Основными обнаруженными компонентами газовой фазы над мицелием ЭГ были ацетон (масса 58), пентан (массы фрагментов 53, 55, 56, 57, 70, 72), уксусная кислота (масса 60). Концентрации указанных компонент: ацетон 0.2–12 ppb, пентан до 0.5 ppb, уксусная кислота до 0.15 ppb. При этом уксусная кислота в некоторых случаях появлялась только через несколько дней после завершения активного роста или полностью отсутствовала. Типичные масс-спектры штаммов VI 21 *L. muscarium* и VI 5 *L. lecanii* представлены на рис. 2, 3.

В этих измерениях впервые были зарегистрированы наличие сернистого газа (масса 64, 66), который известен как фумигатор для борьбы с насекомыми-вредителями [20,21], а так же гексил ацетата (масса 84). Особенно большая концентрация сернистого газа (41 ppb) наблюдалась у штамма VI 29 *L. lecanii* (рис. 4), проявляющего сильную репеллентность для хищных клопов ориусов. Нами было установлено, что сернистый газ вызывает снижение плодовитости сосущих вредителей (тлей и трипсов).

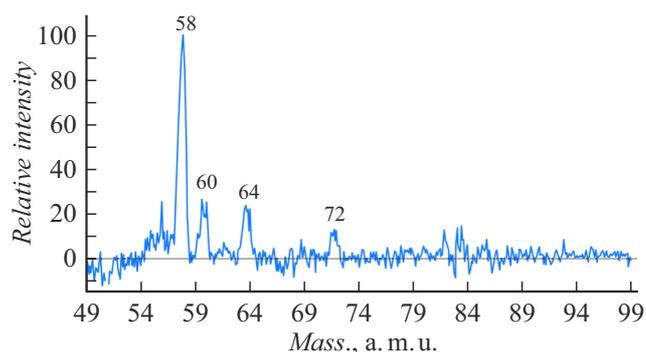


Рис. 2. Масс-спектр штамма VI 21 *L. muscarium*.

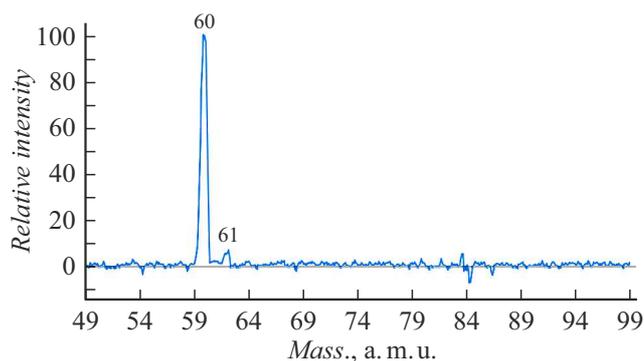


Рис. 5. Масс-спектр воздушной среды у гусениц капустной совки *Mamestra brassicae* L. после кормления.

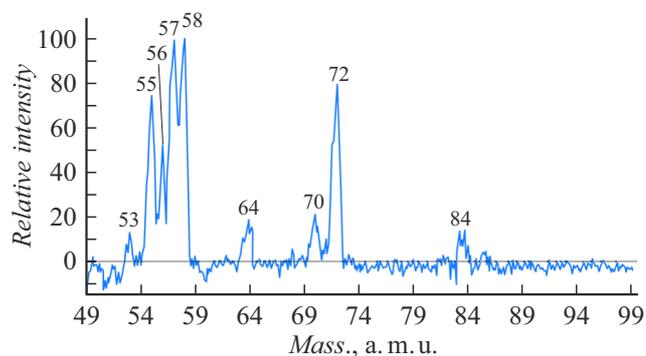


Рис. 3. Масс-спектр штамма VI 5 *L. lecanii*.

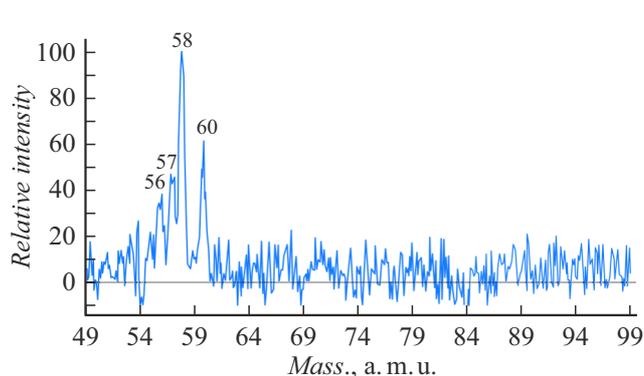


Рис. 6. Масс-спектр воздушной среды у щитников *Podisus maculiventris* S.

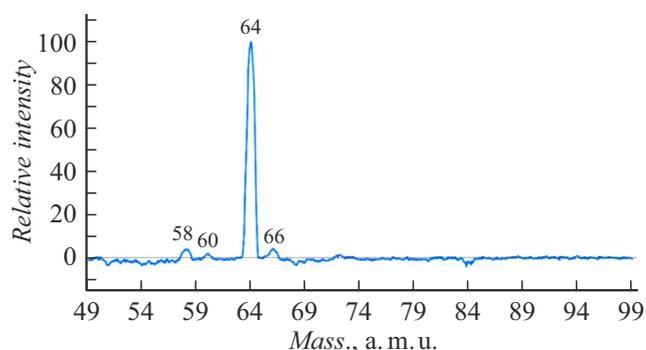


Рис. 4. Масс-спектр штамма VI 29 *L. lecanii*.

2.3. Гусеницы капустной совки *Mamestra brassicae* L.

Для анализа гусеницы капустной совки высаживались из садка в отдельную вialу объемом 20 ml в количестве 3 экземпляров и содержались в ней 2 h. После этого анализировался состав воздуха в вialах. Измерения проводились с гусеницами до их кормления и после (рис. 5). Основным компонентом ЛОС оказалась уксусная кислота (массы 60, 61), причем ее концентрация у гусениц до кормления составляла 0.5 ppm, а после кормления 1 ppm.

2.4. Хищные клопы *Podisus maculiventris* S.

Для анализа клопы высаживались из садка в отдельную герметичную емкость объемом 20 ml в количестве 7 экземпляров и содержались в ней 3 h. После этого анализировался состав воздуха в вialах. Измерения проводились с клопами после кормления (рис. 6). Основными компонентами ЛОС были ацетон и уксусная кислота. Кроме того выявлены неидентифицированные пока компоненты с массами 55 и 57 a.m.u.

Выводы

Метод анализа ЛОС воздуха, выделяемого живыми организмами, с помощью квадрупольного масс-спектрометра с прямым вводом пробы позволяет производить идентификацию компонент воздуха и измерять их концентрации в режиме реального времени. В результате проведенных экспериментов показано, что чувствительность масс-спектрометра МС7-200 достаточна для регистрации в режиме реального времени значимых для неинвазивной диагностики заболеваний компонент выдыхаемого воздуха человека. Впервые выявлен сернистый газ у энтомопатогенных грибов рода *Lecanicillium*, влияющий на поведенческие реакции сосущих насекомых, впервые зафиксировано интенсивное выделение

паров уксусной кислоты гусеницами капустной совки. Предложенный метод прямого анализа и получаемая информация позволяют изучать механизмы процессов обмена веществ в живых организмах.

Финансирование работы

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания 075-00780-19-02.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] Е.В. Степанов. Тр. ИОФАН, **61**, 5 (2005).
- [2] F. Di Francescoa, R. Fuocob, M.G. Trivellaa, A. Ceccarinib. *Microchem. J.*, **79**, 405 (2005). DOI: 10.1016/j.microc.2004.10.008
- [3] B. Buszewski, M. Kesy, T. Ligor, A. Amann. *Biomed. Chromatogr.*, **21**, 553 (2007). DOI: 10.1002/bmc.835
- [4] C. Lourenco, C. Turner. *Metabolites*, **4**, 465 (2014). DOI: 10.3390/metabo4020465
- [5] В.Л. Вакс, Е.Г. Домрачева, Е.А. Собакинская, М.Б. Черняева. *УФН*, **184** (7), 739 (2014). DOI: 10.3367/UFNr.0184.201407d.0739
- [6] M. Phillips. *Sci. Am.*, **267** (1), 74 (1992). DOI: 10.1038/scientificamerican0792-74
- [7] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R.N. Cataneo. *J. Chromatogr. B*, **729** (1–2), 75 (1999). DOI: 10.1016/S0378-4347(99)00127-9
- [8] A.M. Leone, L.E. Gustafsson, P.L. Francis, M.G. Persson, N.P. Wiklund, S. Moncada. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **201** (2), 883 (1994). DOI: 10.1006/bbrc.1994.1784
- [9] Е.И. Савельева, О.П. Гаврилова, Т.Ю. Гагкаева. *Экологическая химия*, **23** (2), 110 (2014).
- [10] H.J. Vreman, J.J. Mahoney, D.K. Stevenson. *Atmos. Environ.*, **27** (14), 2193 (1993). DOI: 10.1016/0960-1686(93)90049-5
- [11] A.V. Chugunov, V.I. Novoderezhkin, T.V. Razumikhina, V.Ya. Panchenko. *Proc. SPIE*, **1922**, 18 (1992).
- [12] Е.В. Степанов, В.А. Миляев. *Квант. электроника*, **32** (11), 987 (2002). DOI: 10.1070/QE2002v032n11ABEN002333
- [13] А.Г. Кузьмин, Е.И. Ткаченко, Л.С. Орешко, Ю.А. Титов, А.С. Балабанов. *Медицинский академический журнал*, **16** (4), 106 (2016).
- [14] V.V. Manoilov, A.G. Kuzmin, U.A. Titov. *J. Anal. Chem.*, **71** (14) 1301 (2016). DOI: 10.1134/S1061934816140094
- [15] А.Н. Шевченко, А.Г. Кузьмин, Ю.А. Титов. *Научное приборостроение*, **28** (2), 62 (2018). DOI: 10.18358/np-28-2-i6268
- [16] Л.В. Новиков, В.В. Манойлов, А.Г. Кузьмин, Ю.А. Титов, И.В. Заруцкий, А.О. Нефедов, А.В. Нефедова, А.И. Арсеньев. *Научное приборостроение*, **30** (4), 94 (2020). DOI: 10.18358/np-30-4-i94105
- [17] T.P.J. Blaikie, J.A. Edge, Gus Hancock, D. Lunn, C. Megson, R. Peverall, G. Richmond, G.A.D. Ritchie, D. Taylor. *J. Breath Res.*, **8** (4) 2014. DOI: 10.1088/1752-7155/8/4/046010
- [18] K. Dryahina, V. Pospíšilová, K. Sovová, V. Shestivska, J. Kubišta, A. Spesyvyi, F. Pehal, J. Turzíkova, J. Votruba, P. Španěl. *J. Breath Res.*, **8**, 037109 (2014). DOI: 10.1088/1752-7155/8/3/037109
- [19] Г.В. Митина, Е.А. Степаньчева, А.А. Чоглокова. *Вестник защиты растений*, **103** (4), 265 (2020). DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-4-13466
- [20] J. Riudavets, M.J. Pons, R. Gabarra, C. Castañé, O. Alomar, L.F. Vega, S. Guri. *J. Stored Prod. Res.*, **57**, 58 (2014). DOI: 10.1016/j.jspr.2013.12.003
- [21] Y.B. Liu. *J. Econ. Entomol.*, **112** (2), 597 (2019). DOI: 10.1093/jee/toy373