

Pro gradu -tutkielma

Vetysyanidin pitoisuus diabeetikoiden ja terveiden ihmisten uloshengitysilmassa



Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Kemian laitos

Fysikaalisen kemian laboratorio

Mirva Skyttä 27. 1. 2013

Sisältö

1	Johdanto	5
2	Keuhkojen toiminta ja kaasujen vaihto	8
3	Hengitysanalyysin menetelmistä	15
3.1	Näytteenotossa huomioon otettavia tekijöitä	15
3.2	Analyyttiset tekniikat	18
3.2.1	Massaspektrometriset ja kromatografiset tekniikat	18
3.2.2	Ioniliikkuvuusspektrometria, IMS	23
3.2.3	Elektroniset sensorit	24
3.2.4	Laserspektroskopia	25
3.2.5	Ontelovaimenemisspektroskopia, CRDS	31
4	Kliinisiä hengitystestejä	34
5	Vetysyanidi hengitysilmassa	40
6	Diabetes	44
6.1	Diabetes ja hengitysanalyysi	45
7	Kokeelliset menetelmät	47
7.1	Koehenkilöt	47
7.1.1	Kontrollit	47
7.1.2	Diabeetikot	48
7.2	Näytteenotto	50
7.3	Ontelovaimenemisspektrometri	52
7.4	Spektrometrin herkkyys	55
7.5	Mittaustulosten analysointi	56
8	Tulokset	59
9	Yhteenvedo ja johtopäätökset	63

Kuvat

Numero	Kuvaus	Sivunumero
1	Hengityselimistön tärkeimmät osat [12]	9
2	Keuhkorakkulat [13]	9
3	Ekspirogrammi kaasulle, joka vaihtuu keuhkorakkuloissa	14
4	Vesimolekyylin symmetrinen ja epäsymmetrinen venytys [39]	28
5	CH-ryhmän kulmataivutukset [39]	28
6	Ontelovaimenemisspektroskopian peruseräite	32
7	Kaaviokuva koelaitteistosta	53
8	Esimerkkispektri sovitukseen	54
9	Kontrollihenkilöiden HCN-konsentraatiojakauma	61
10	Diabeetikoiden HCN-konsentraatiojakauma	61

Taulukot

Numero	Kuvaus	Sivunumero
1	Sähkömagneettinen spektri [15]	26
2	Analyyttisten menetelmien vertailua	35
3	Yhteenveto kontrollihenkilöistä	48
4	Yhteenveto diabeetikoista	50
5	Kontrollihenkilöiden tulokset	59
6	Diabeetikoiden tulokset	60

Lyhenneluettelo

Lyhenne	Sanoista	Suomennos
AOM	acousto-optic modulator	akusto-optinen modulaattori
ATP	adenosine triphosphate	adenosiinitrifosfaatti
BS	beam splitter	säteenjakaaja
CALOS	cavity leak-out absorption spectroscopy	
CEAS	cavity enhanced absorption spectroscopy	
CI	chemical ionization	kemiallinen ionisaatio
CRDS	cavity ring-down spectroscopy	ontelovaimenemisspektroskopia
ECDL	external cavity diode laser	ulkoisen ontelon diodilaseri
EI	electron impact ionization	elektroni-ionisaatio

Lyhenne	Sanoista	Suomennos
FAB	fast atom bombardment	nopeilla atomeilla pommitus
FDA	United States Federal Drug Administration	Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkintävirasto
FIR	far infrared radiation	kauko-infrapunasäteily
FSR	free spectral range	vapaa spektrialue
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry	kaasukromatografi-massaspektrometri
HbA _{1c}	glycosylated haemoglobin	sokerihemoglobiini
hsCRP	high-sensitivity C-reactive protein	C-reaktiivinen proteiini
ICOS	integrated cavity output spectroscopy	
IMS	ion mobility spectrometry	ioniliikkuvuusspektrometria
MDAL _{shot}	minimum detectable absorption loss in a single shot	pienin havaittavissa oleva absorptio yhdellä vaimenemisella
MFC	mass flow controller	massavirtaussäädin
MIR	mid infrared radiation	keski-infrapunasäteily
m/z	mass per charge ratio	massan ja varauksen suhde
NIR	near infrared radiation	lähi-infrapunasäteily
OI	optical isolator	optinen eristäjä
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
PBTK	physiologically based toxicokinetic modeling	fysiologiaan perustuva toksikoki-neettinen malli
ppb	parts per billion	miljardisosa
ppm	parts per million	miljoonasosa
ppt	parts per trillion	triljoonasosa
PTR-MS	proton transfer reaction mass spectrometry	protoninsiirtoreaktio-massaspektrometria
QD	quadrupole	kvadrupoli
ROS	reactive oxygen species	reaktiivinen happiyhdiste
sHDL	high-density lipoprotein	veren hyvä kolesteroli
SIFT-MS	selected ion flow tube mass spectrometry	
sKOL	total cholesterol	kokonaiskolesteroli
sKREA	creatine	kreatiini
SPME	solid phase microextraction	kiinteäfaasimikrouutto
sTG	triglyceride	triglyseridi
TOF	time-of-flight	lentoaika
VOCs	volatile organic compounds	haihtuvat orgaaniset yhdisteet
WHO	World health organization	Maailman terveysjärjestö

1 Johdanto

Hengitysanalyysin juuret ulottuvat antiikin Kreikan ajoille, jolloin tiedettiin, että tiettyjä sairauksia voidaan tunnistaa uloshengityksen hajun perusteella. Nykyaikainen hengitysanalyysi alkoi 1970-luvulla, jolloin Pauling yhteistyökumppaneineen onnistui määrittämään yli 200 yhdistettä ihmisen uloshengitysilma-kaasukromatografian avulla [1]. Hengitysanalyysiä on sovellettu esimerkiksi erilaisiin altistustutkimuksiin, alkoholin käyttöön liittyvään lainvalvontaan ja elimistön itsensä tuottamien (endogeenisten) yhdisteiden tutkintaan. Endogeeniset yhdisteet saattavat liittyä muun muassa sairauksiin. Sairauksien toteamiseen ja hoitamiseen käytetään esimerkiksi isotooppimerkittyä yhdistettä, jonka erittymistä hengitysilmaan seurataan [2]. Monesti bakteeriviljelmän yläpuolisen höyrytilan koostumuksen tai ihon erittämien kaasujen mittaaminen luetaan myös hengitysanalyysin osa-alueiksi.

Keuhkojen tehtävänä on toimia kaasujen vaihtajana elimistön ja ympäristön välillä. Tärkeimpiä keuhkoissa vaihtuvia kaasuja ovat happi ja hiilidioksidi, jotka liittyvät pääasiassa soluhengitykseen. Verenkierron mukana kulkee monia muita kaasuja, jotka erittyvät keuhkoista uloshengitettävään ilmaan. Uloshengityksessä olevan yhdisteen osapaineen ajatellaan vastaavan suoraan yhdisteen osapainetta veressä [3]. Tässä mielessä uloshengitysilma kertoo elimistön tilasta. Sen mittaaminen on verikokeisiin verrattuna elimistöön kajoamaton tapa tarkastella kehomme tilaa. Uloshengitysilma on ainutlaatuinen, koska sitä voidaan kerätä rajattomia määriä.

Hengitysnäytteenotto on yksinkertaista, minkä vuoksi jopa potilas itse osaa kerätä oman hengitysnäytteensä. Yhdisteen osapaineen suhde veren ja uloshengitysilman välillä on kuitenkin todellisuudessa monimutkainen riippuen siitä, missä hengityselimistön osassa tutkittavat kaasut vaihtuvat. Vaihtumisen tapahtumapaikka riippuu pääasiassa yhdisteen vesiliukoisuudesta [3], mikä puolestaan määrää sen, miten näyte tulisi kerätä. Hengitysanalyysin kehittymistä hidastaa myös uloshengitysilmaan erittyvien yhdisteiden biokemiallisen alkuperän ymmärtäminen.

Oikeanlaisen näytteenoton lisäksi uloshengityksen mittaaminen vaatii toistettavia ja luotettavia mittauksia, joissa uloshengitysilman suuri vesipitoisuus ei aiheuta

ongelmia. Laitteiden soveltaminen kenttätutkimukseen (esimerkiksi sairaaloissa) vaatii niiltä myös hyvää herkkyyttä, selektiivisyyttä ja nopeutta, helppokäyttöisyyttä ja kannettavuutta tai liikuteltavuutta sekä edullisia hankinta- ja käyttökuluja. Näiden kaikkien ominaisuuksien toteuttavan laitteen keksiminen olisi teoriassa läpimurto hengitysanalyysille, mutta käytännössä vaikea toteuttaa. Nykyään voidaankin ajatella, että erilaiset laitteistot täydentävät toisiaan jokainen omilla hyvillä ominaisuuksillaan. Tässä tutkielmassa vertaillaan viime vuosina käytetyimpiä hengitysanalyysiin soveltuvia mittalaitteita, niiden sovelluksia sekä heikkouksia ja vahvuuksia hengitysanalyysin kannalta. Käytetyimmät menetelmät perustuvat useimmiten massaspektrometriaan, kromatografiaan tai absorptiospektroskopiaan.

Asetonin hedelmäinen haju hengityksessä liitetään usein diabetekseen [4]. Diabetesta sairastavien lukumäärä on jatkuvassa kasvussa ympäri maailmaa, minkä vuoksi hengitysanalyytikot ovat kiinnittäneet diabetespotilaiden hengitysilman tutkimiseen aiempaa enemmän huomiota. Diabetes on krooninen aineenvaihdunnan häiriö, jossa insuliinin tuotanto on joko kokonaan lakannut tai sen käyttö elimistössä on häiriintynyt [5]. Insuliinitoiminnan häiriintyminen kasvattaa veressä olevan glukoosin määrää, sillä insuliini edistää veren glukoosin siirtymistä soluihin. Suurin osa tähän mennessä tehdyistä diabetekseen liittyvistä hengitysanalyysikokeista onkin pyrkinyt etsimään hengitykseen erittyvien yhdisteiden ja veren glukoositasojen välisiä korrelaatioita. Näiden kokeiden avulla on haettu veren glukoosin mittaamiseen vaadittavalle verikokeelle vaihtoehtoja, kehoon kajoamatonta menetelmää.

Hoitamattomana diabetes voi johtaa moniin komplikaatioihin, joita hengitysanalyytikot ovat tutkineet vielä vähän. Esimerkiksi iho- ja pehmytkudosinfektiot ovat yleisempiä ja haitallisempia diabeetikoilla kuin terveillä ihmisillä [6]. Diabetes on muun muassa yksi riskitekijöistä *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin (PA) aiheuttamille infektioille [7]. Tiettyjen PA-bakteeriviljelmien yläpuolisesta höyrytilasta on mitattu vetysyanidia [8], jota voidaan myös havaita pieninä pitoisuuksina terveiden ihmisten uloshengitysilmassa [9].

Tutkielman kokeellisessa osuudessa mitattiin diabeetikoiden ja terveiden ihmis-

ten uloshengitysilman vetysyanidipitoisuuksia. Osalla diabeetikoista oli jonkin asteinen munuaisvaurio, johon saattaa liittyä PA-bakteerin aiheuttama infektio. Mittausmenetelmänä käytettiin laserspektroskopiaan perustuvaa ontelovaimenemisspektrometriaa (engl. cavity ring-down spectrometry, CRDS). CRDS- menetelmän vahvuuksia ovat sen kyky reaaliaikaiseen on-line -mittaamiseen ja suuri herkkyys. CRDS on myös hyväksi todettuja massaspektrometrisiä menetelmiä edellä kehityksessä, koska siitä on jo olemassa erilaisia kannettavia malleja, joiden ylläpitokustannukset ovat pieniä. Lisäksi se on käytettävyydeltään yksinkertainen, minkä vuoksi se sopisi esimerkiksi sairaalaympäristöön käytettäväksi.

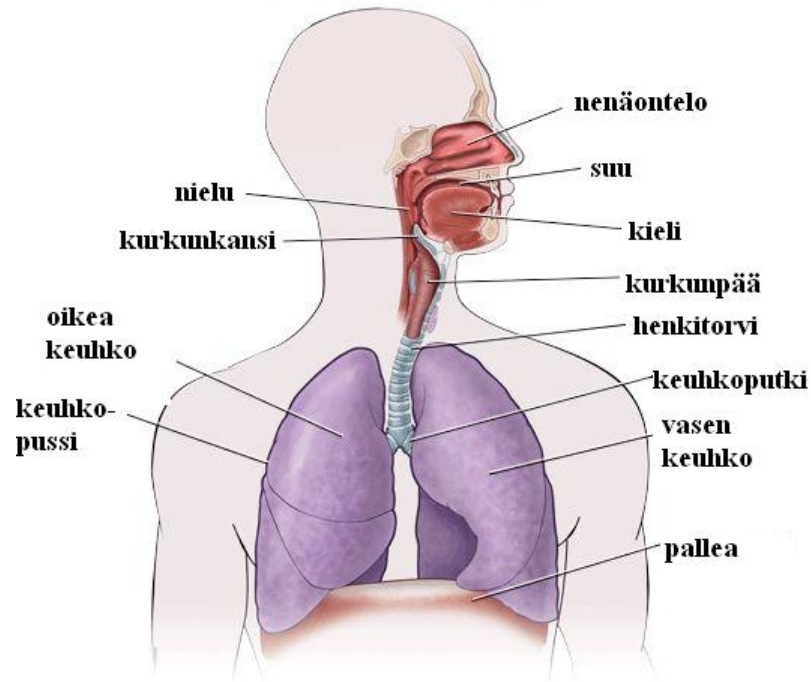
2 Keuhkojen toiminta ja kaasujen vaihto

Sisäänhengitettävässä ilmassa on pääasiassa typpeä, happea ja jäämäpitoisuuksina monia muita kaasuja. Uloshengitysilmassa on puolestaan prosenttipitoisuuksia happea, hiilidioksidia ja vettä sekä jäämäpitoisuuksina lukuisia haihtuvia yhdisteitä [10]. Kun kaasun pitoisuus on tilavuuden biljoonasosa (engl. parts per trillion, ppt), miljardiosa (engl. parts per billion, ppb) tai miljoonasosa (engl. parts per million, ppm), puhutaan jäämäpitoisuuksista. Jäämäkaasujen määrä ja laatu vaihtelee paljon ihmisten välillä ja alkuperä voi olla joko endogeeninen tai eksogeeninen. Endogeeniset yhdisteet ovat peräisin verenkierrosta, hengitysteistä tai suuontelosta, joihin yhdisteet ovat joutuneet esimerkiksi eri elimien aineenvaihdunnan seurauksena. Ne voivat olla peräisin myös elimistön ulkopuolisista eli eksogeenisistä lähteistä, kuten ruuasta, juomasta tai sisäänhengitetystä ilmassa. Endogeeniset yhdisteet uloshengitysilmassa voivat heijastaa elimien normaalia tai epänormaalia toimintaa, kun taas eksogeenisten yhdisteiden avulla voidaan tutkia muun muassa viimeaikaista altistumista erilaisille yhdisteille.

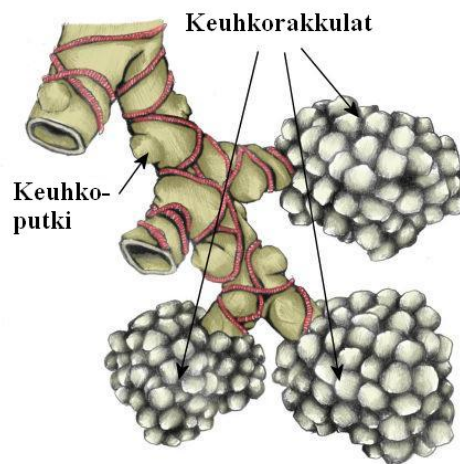
Keuhkojen pääasiallinen tehtävä on tuoda elimistöömme happea ja poistaa soluhengityksessä syntynyttä hiilidioksidia. Happea tarvitaan solujen mitokondrioissa, joissa esimerkiksi glukoosi hapettuu hapen avulla energian lähteenä käytettäväksi adenosiniinifosfaatiksi (engl. adenosine triphosphate, ATP). Tässä niin sanotussa soluhengityksessä syntyy samalla hiilidioksidia, joka kuljetetaan verenkierron mukana takaisin keuhkoihin. Hengityselimistö (kuva 1) koostuu ylähengitysteistä eli sieraimista, nielusta, kurkunkannesta, henkitorvesta ja kurkunpäästä sekä alahengitysteistä eli henkitorvesta, keuhkoputkista ja keuhkorakkuloista (kuva 2) [11].

Hengittäminen tapahtuu joko suun tai nenän kautta. Suu- tai nenäontelossa hengitysilma sekoittuu, lämpenee ja kostuu. Hengittämistapahtumaan sisältyy neljä eri vaihetta: sisäänhengitys, kaasujen vaihto keuhkojen ja veren välillä sekä kaasujen vaihto veren ja kudosten välillä ja uloshengitys. Kaasujen vaihtoa kontrolloivat konvektio ja diffuusio, yhdisteen vesiliukoisuus, energian ja massansiirtolait sekä kemialliset reaktiot [11]. Konvektio tarkoittaa kulkeutumista massan mukana ja diffuusio kulkeutumista hiukkasten sisäisen energian vaikutuksesta. Konvektio voi tapahtua joko avaruudellisten tiheysgradienttien tai ulkoisen hydrostaattisen paineen vaikutuksesta. Se voi

HENGITYSELIMISTÖ



Kuva 1: Hengityselimistön tärkeimmät osat [12].



Kuva 2: Keuhkorakkulat [13].

olla joko laminaarista tai turbulenttia. Laminaarisessa virtauksessa kaikki komponentit virtaavat samaan suuntaan ja turbulentissa satunnaisesti kaikkiin suuntiin. Konvektio kuljettaa kaasuja millimetreistä metreihin [11].

Konvektion lisäksi kaasuja kuljettaa diffuusio. Diffuusiossa kulkeutuminen tapahtuu suuren pitoisuuden suunnasta pienen pitoisuuden suuntaan. Kokeellisesti on

osoitettu, että diffuusiolle pätee Fickin ensimmäinen diffuusiolaki [11]:

$$J = -D \frac{dN}{dz}, \quad (1)$$

missä J on kaasun vuo (yksikkö $\text{ml s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), D on diffuusiokerroin (yksikkö cm^2/s), N on molekyylien lukumäärä tilavuusyksikköä kohden ja z virtaussuunta. Kaasun konsentraatio riippuu sen osapaineesta ja liukoisuudesta. Fickin laki pätee laimeille liuoksille ja diffuusion kuljettama matka on mikroneista millimetreihin [11]. Diffuusiokerroin kertoo, kuinka helposti molekyyli läpäisee kudoksen. Mitä suurempi diffuusiokerroin on, sen helpommin molekyyli läpäisee hengitysteiden kudoksen.

Kaasuseoksessa jokaisen kaasun osapaine on suoraan verrannollinen konsentraatioon. Se, kuinka paljon kaasua siirtyy verenkierron mukana kudoksiin, riippuu verenkierron ja hengityksen nopeudesta, sydämen tehokkuudesta ja kaasun konsentraatiosta veressä. Siirtymiseen vaikuttavat myös erittyvän molekyylin fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, kuten polaarisuus ja jakautumiskerroin ilman ja veren välillä [3]. Esimerkiksi rasvaliukoiset molekyylit saattavat varastoitua kudoksiin ja olla erittymättä hengitysilmaan. Happi ja hiilidioksidi liukenevat huonosti vereen ja niillä kummallakin on omat siirtomekanisminsa veressä. Suurin osa hapesta sitoutuu veren punasolujen hemoglobiiniin, joka koostuu neljästä rautaa sisältävästä rengasrakenteesta. Hiilidioksidin siirtyminen on huomattavasti monimutkaisempaa. Se kulkeutuu veressä kolmessa eri muodossa: liunneena plasmaan, sitoutuneena hemoglobiiniin ja bikarbonaattina plasmassa [14].

Keuhkoissa vaihtuu hapen ja hiilidioksidin lisäksi myös monia muita kaasuja. Monesti kaasun osapaineen suhde hengityksessä ja veressä on monimutkainen riippuen siitä, missä kaasujen vaihto tapahtuu. Kaasujen vaihdon sijainti riippuu voimakkaasti kaasun liukenevuudesta veteen ja siten vereen, mitä voidaan kuvata vesi-ilmajakautumiskertoimella, sillä kudokset ja veri ovat pääasiassa vettä. Jos yhdisteen jakautumiskerroin veden ja ilman välillä on yli 500, puhutaan hyvin vereen liukenevasta kaasusta. Jos taas jakautumiskerroin on alle yhden, kaasu on huonosti vereen liukeneva. [11]

Kaasun osapaineen ja nestekonsentraation välillä on Henryn lain mukainen lineaarinen riippuvuus [15]:

$$p_i = HC_i, \quad (2)$$

missä p_i on kaasun i osapaine (yksikkö mmHg), H Henryn lain vakio (yksikkö mmHg l mol⁻¹) ja C_i konsentraatio (yksikkö mol l⁻¹). Liukoisuus riippuu voimakkaasti lämpötilasta: lämpötilan kasvaessa liukoisuus laskee. Hengitysteiden lämpötila vaihtelee huomattavasti sisään- ja uloshengityksen välillä veden haihtumisesta johtuen, mikä vaikuttaa kaasun liukenevuuteen hengitysteissä. Huonosti vereen liukenevat yhdisteet (esimerkiksi etaani ja syklopropani) vaihtuvat lähinnä keuhkorakkuloissa ja hyvin vereen liukenevat (esimerkiksi etanoli ja metanoli) hengitysteissä. Liukenevuudeltaan näiden väliin sijoittuvat yhdisteet (esimerkiksi asetoni) vaihtuvat osittain hengitysteissä ja osittain keuhkorakkuloissa. [11]

Kaasua sanotaan reaktiiviseksi silloin, kun se reagoi kemiallisesti esimerkiksi hengitysteiden kanssa. Muutoin kaasu on inertti. Yksinkertainen tapa kuvata inertin kaasun konsentraation suhdetta veren ja hengitysilman välillä on Farhin kehittämä:

$$C_A = \frac{\dot{V}_A C_I + C_v}{\lambda_{b:ilma} + \frac{\dot{V}_A}{\dot{Q}_c}}, \quad (3)$$

missä C_A (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$) on yhdisteen konsentraatio keuhkorakkuloissa, joka vastaa siis mitattavaa konsentraatiota ja C_I (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$) on yhdisteen konsentraatio sisäänhengitettävässä ilmassa [16]. Yhtälö ilmaisee siis, että inertin kaasun konsentraatio keuhkorakkuloissa riippuu yhdisteen konsentraatiosta veressä C_v (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$), yhdisteelle ominaisesta veren ja ilman välisestä jakautumiskertoimesta $\lambda_{b:ilma}$ ja ventilaatio-perfuusio-suhteesta $\frac{\dot{V}_A}{\dot{Q}_c}$, missä \dot{V}_A (yksikkö l min⁻¹) on keuhkorakkuloiden tuuletusnopeus ja \dot{Q}_c (yksikkö l min⁻¹) sydämen tehokkuus.

Keuhkojen limakalvot ja veri muistuttavat fysiko-kemiallisilta ominaisuuksiltaan

vettä [3]. Siksi hyvin vereen liukenevat kaasut vaihtuvat hengitysteissä, jossa kaasujen vaihto riippuu muun muassa hengitysteiden lämpötilasta, keuhkoputkien verenkierrosta, hengitystavasta ja jakautumiskertoimesta. Vesiliukoisten molekyylien konsentraatio pienenee uloshengityksessä matkalla keuhkorakkuloista ylähengitysteihin, minkä vuoksi konsentraatio veressä on suurempi kuin hengityksestä mitattava konsentraatio. Hengitysnopeutta ja -tilavuutta kasvattamalla voidaan vähentää molekyylien vuorovaikutusta hengitysteiden kanssa, jolloin hengityksen loppuosa kuvastaa paremmin todellista keuhkorakkuloissa olevan yhdisteen määrää.

J. King yhteistyökumppaneineen [3] ehdottaa, että vesiliukoisen yhdisteen konsentraation arvioimiseen uloshengitysilmassa kannattaa käyttää isotermistä uudelleenhengitystä, jotta yhdisteen pitoisuuden aliarviointi voidaan välttää. Isotermisessä uudelleenhengityksessä uudelleenhengitettävää ilmaa lämmitetään, jotta hengitysteiden pinnat lämpenevät, minkä jälkeen samaa ilmaa hengitetään uudelleen. He arvioivat, että esimerkiksi vesiliukoisen metanolin konsentraatiota aliarvioidaan kertoimella 1,5, jos näyte otetaan perinteiseen tapaan. He ehdottavat, että hengitysteissä tapahtuva kaasujen vaihto voidaan huomioida jakamalla keuhkot erikseen keuhkoputkia ja keuhkorakkuloita kuvaaviin osiin.

Matemaattinen malli vesi- ja veriliukoiselle yhdisteelle poikkeaa Farhin kehittämästä. Yhdisteen pitoisuus keuhkoputkissa C_{bro} (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$) voidaan arvioida yhtälöllä:

$$C_{\text{bro}} = \frac{r_{\text{bro}}C_{\text{I}} + C_{\text{a}}}{z(T)\lambda_{\text{b:ilma}} + r_{\text{bro}}}, \quad (4)$$

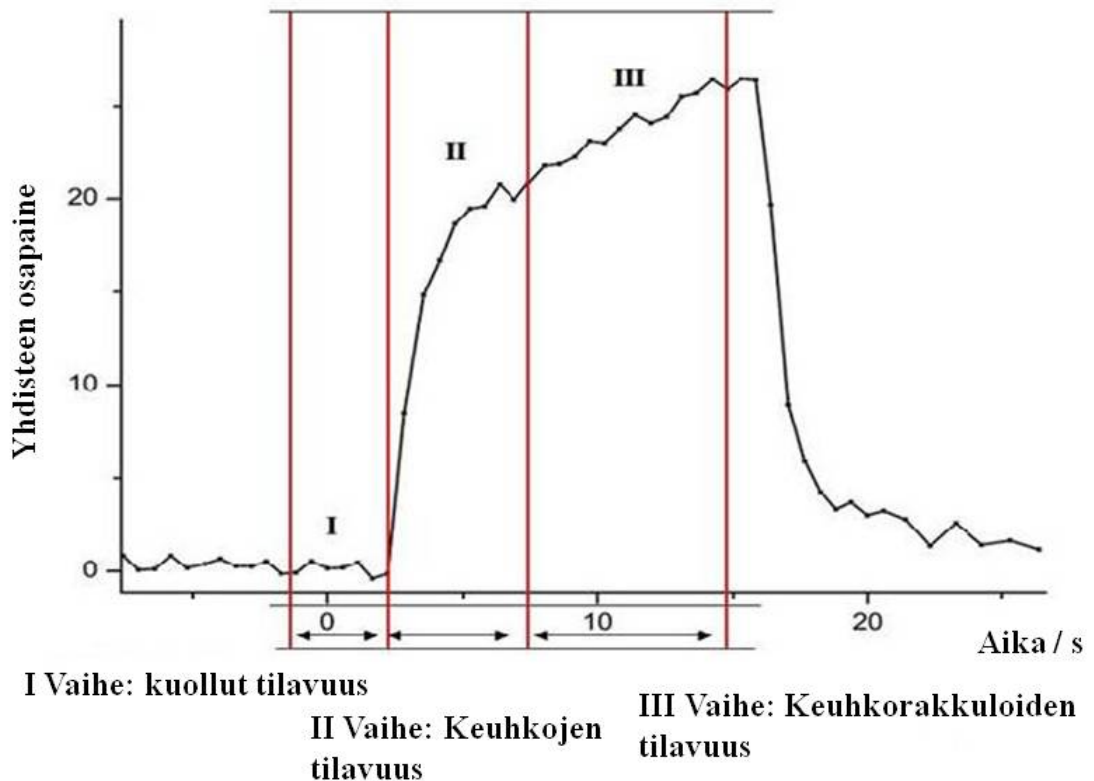
missä $r_{\text{bro}} = \frac{\dot{V}_A}{q_{\text{bro}}\dot{Q}_c}$ liittyy keuhkoputkien ventilaatio-perfuusio suhteeseen [3]. Yhdisteelle ominainen verenkierron osuus keuhkoputkiin q_{bro} on likimain 0,01. C_{I} (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$) on yhdisteen konsentraatio sisäänhengitettävässä ilmassa, C_{a} (yksikkö $\mu\text{g l}^{-1}$) valtimoissa olevan yhdisteen konsentraatio ja termi $z(T)\lambda_{\text{b:ilma}}$ kuvaa hengitysteissä tapahtuvan kaasujen vaihdon lämpötilariippuvuutta. Kerroin $z(T) = \frac{\lambda_{\text{limakalvo:ilma}}(T)}{\lambda_{\text{limakalvo:ilma}}(37^\circ\text{C})}$ sisältää muutokset yhdisteiden liukenevuudessa hengitysteiden limakalvoille ja keuhko-

putkien vereen keskimääräisen lämpötilan T funktiona. Yhtälö (4) olettaa, että mitattava konsentraatio heijastaa keuhkoputkien konsentraatiota ja pätee vain vesiliukoisille yhdisteille. Lisäksi oletetaan, että limakalvojen fysiko-kemialliset ominaisuudet muistuttavat veden ominaisuuksia, minkä vuoksi $\lambda_{\text{limakalvo:ilma}}$ voidaan arvioida vastaavan vesi-ilmajakautumiskertoimen avulla.

Keuhkoissa ja hengitysteissä vaihtuvien kaasujen erot voidaan havaita niiden ekspiogrammeista [17]. Keuhkorakkuloissa vaihtuvan kaasun ekspiogrammi on kuvassa 3. Siitä nähdään, että vaiheessa I ei ole tutkittavaa kaasua. Tätä aluetta kutsutaan keuhkojen kuolleeksi tilavuudeksi. Nopeasti nouseva vaihe II kuvastaa siirtymää kuolleesta tilavuudesta keuhkorakkuloissa olevaan ilmaan ja vaiheessa III havaitaan kaasut, jotka ovat vaihtuneet keuhkorakkuloissa. Mittaamalla hengityksestä vain tämä osa, saadaan arvio kaasun osapaineesta keuhkorakkuloissa. Kaasulle, joka vaihtuu hengitysteissä, ekspiogrammi on hieman erilainen. Siitä nimittäin puuttuu kokonaan vaihe I, sillä jo hengitystiet osallistuvat kaasujen vaihtoon. Kuvassa 3 oleva ekspiogrammi poikkeaa normaalista, sillä normaalin ekspiogrammin huippu on lähes vaakasuora, mutta tässä huipun kulmakerroin on suuri. Tämä johtuu siitä, että kuvan tekemiseksi uloshengitystä on hidastettu, jolloin keuhkorakkulat tyhjenevät epätasaisesti.

Normaalin terveen ihmisen hengitysnopeus on noin 12 - 20 kertaa minuutissa. Hengitysnopeuteen vaikuttavat esimerkiksi terveydentila, ikä, tupakointi, rasitus ja painoindeksi. Keuhkojen normaali tilavuus vaihtelee puolestaan fyysisestä kunnosta, sukupuolesta, etnisestä taustasta ja iästä riippuen. Miehillä maksimitilavuus eli vitaukkiparasiteetti on noin 6 litraa ja naisilla 4,2 litraa. Levossa ihminen ei hengittäessään käytä läheskään koko osuutta keuhkojen kokonaiskapasiteetista. Keskimäärin miehet hengittävät 600 millilitraa ja naiset 500 millilitraa yhdellä sisään- tai uloshengityskerralla. Sisään- ja uloshengitettyä tilavuutta voidaan mitata spiometrillä. Hyperventiloinnista puhutaan silloin, kun henkilö hengittää tarpeettoman nopeasti, minkä vuoksi hengityksen hiilidioksidipitoisuus kasvaa. Hypoventilaatiossa henkilö ei puolestaan kykene hengittämään riittävästi varmistaakseen elimistön tarvittavan kaasujenvaihdon.

Kuten edeltä voi huomata, täytyy hengitysanalyysissä ottaa huomioon lukuisia



Kuva 3: Ekspiogrammi kaasulle, joka vaihtuu keuhkorakuloissa. Ekspiogrammin huippu poikkeaa normaalista, sillä normaalisti huippu on lähes tasainen. Kuvan poikkeuksellinen käyttäytyminen johtuu siitä, että piirroksen tekemiseksi uloshengitystä on pidennetty, minkä vuoksi keuhkorakkulat tyhjenevät epätasaisesti.

tekijöitä. Esimerkiksi tutkittavan yhdisteen eksogeeniset lähteet, yhdisteen kemialliset ja fysikaaliset ominaisuudet, kaasujen vaihdon sijainti, hengitystapa ja näytteen antajan fysiologia ovat oleellisia tekijöitä. Monet yhdisteet saattavat muun muassa esiintyä jopa uloshengitysilmaa korkeampina pitoisuuksina sisäänhengitettävässä ilmassa, minkä vuoksi ei voida varmuudella sanoa uloshengityksessä olevan yhdisteen alkuperää. Toisaalta jokin yhdiste voi syntyä monissa erilaisissa elimistön toiminnoissa tai esiintyä hengitysilmassa niin pienenä pitoisuutena, että vain nykyajan herkimvät laitteet pystyvät havaitsemaan sen. Seuraavassa kappaleessa esitellään erilaisia hengitysnäytteen keräystapoja, niissä huomioon otettavia asioita sekä hengitysanalyysiin sopivia laitteita.

3 Hengitysanalyysin menetelmistä

3.1 Näytteenotossa huomioon otettavia tekijöitä

Hengitysnäytettä otettaessa keuhkot jaetaan yleensä kahteen erilaiseen toiminnalliseen osaan: 1) kuollut tilavuus ja 2) keuhkorakkuloiden tilavuus [18]. Kuolleeseen tilavuuteen kuuluvat suu, nenä, nielu, henkitorvi ja keuhkoputket (katso kuva 1). Kuollut tilavuus on uloshengityksen alkuosa eli noin 150 millilitraa. Loppuosa uloshengityksestä eli noin 350 millilitraa on niin sanottu keuhkorakkuloiden tilavuus, joka tulee keuhkoissa olevan veren ja ilman väliseltä pinnalta. Riippuen tutkittavasta molekyylistä, kuollut tilavuus voi joko aiheuttaa kontaminaatiota ja laimentaa näytettä tai olla tutkimusten kannalta välttämätön.

Koska uloshengitysilma ei ole homogeenista, täytyy näytteenottotapaan kiinnittää erityistä huomiota. Näytteenkeräykseen ei kuitenkaan ole yksiselitteistä tapaa, sillä jokaiselle yhdisteelle tai yhdisteryhmälle pitäisi olla omat näytteenkeräykseen liittyvät ohjeistuksensa. Ohjeistuksien avulla voidaan vertailla eri laboratorioiden hengitysnäytteiden ottoa ja analysointia. Risby ja Solga [10] ehdottavat, että yhden hengityskerran keräämiseen käytettäisiin samaa menetelmää kuin American Thoracic Society/European Respiratory Society käyttää typpioksidin on-line-määrittämiseen hengityksestä [19]. Menetelmä on kuitenkin kyseenalainen keuhkorakkuloissa vaihtuvan kaasun keräyksessä, sillä typpimonoksidia muodostuu lähinnä hengitysteissä eikä muissa elimissä [20]. Myös hengitysanalyysin tuloksien ilmaisemiseen pitäisi olla yksimielinen standardisoitu tapa. Hengitysanalyyseissä tuloksia on ilmoitettu esimerkiksi yksiköittäminä pitoisuuksina (kuten %, ppm, ppb ja ppt) ja mooleina litrassa.

Hengityksessä olevien yhdisteiden pitoisuudet vaihtelevat eri yksilöiden välillä riippuen esimerkiksi hengitysnopeudesta, iästä, sukupuolesta, painoindeksistä, ruokavaliosta, fysiologiasta ja sairauksista [10]. Helpoin ja yleisin näytteenottotapa on kerätä sekä kuollut tilavuus että keuhkorakkuloiden tilavuus samalla kertaa (engl. mixed expired air). Muita keräystapoja ovat keuhkorakkuloiden ilman keräys (engl. alveolar sampling tai end-tidal air) tai uudelleenhengitetyn ilman keräys (engl. rebreathed air) [18]. Keuhkorakkuloiden ilman keräys sopii parhaiten hydrofobisille yhdisteille ja uu-

delleenhengitetyn ilman keräys hydrofiilisille yhdisteille, kuten King et al. ehdottavat [3].

Näytteenkeräyksen apuna voidaan käyttää esimerkiksi yhdisteelle ominaista hengitysprofiilia eli ekspiogrammia (kuva 3). Ekspiogrammissa yhdisteen pitoisuus uloshengitysilmassa piirretään ajan funktiona. Tällaisen visuaalisen monitorin, tahdistimen tai uloshengityksen virtauksen kontrolloinnin käyttö vähentää yksilöiden välistä vaihtelua ja estää hengitysnäytteen antajaa hyperventiloimasta, sillä keräyksen aikana antaja hyperventiloit helposti [21]. Visuaalisen monitorin avulla voidaan seurata esimerkiksi hengitystilavuutta tai hiilidioksidin osapainetta graafisesti. Tahdistimena voidaan käyttää muun muassa metronomia, joka huolehtii näytteenantajan hengitystiheydestä. Monitoreilla voidaan seurata myös suun paineen vaihteluita.

Keräystä voidaan myös tehostaa normalisoimalla mitattu hiilidioksidi yleisesti hyväksytyyn hiilidioksidin pitoisuuteen, sillä hiilidioksidin osapaineen avulla voidaan kerätä edustavia näytteitä [21]. Sen avulla voidaan vähentää ihmisten välisiä vaihteluita erilaisiin hengitystapoihin liittyen ja seurata hengitysnäytteen laatua. Lisäksi voidaan varmistaa, että näytteen antaja säilyttää tiukan otteen suukappaleeseen ja hengittää varmasti suukappaleen kautta ulos [10]. On siis suositeltavaa kerätä hengitysnäytteet seuraamalla samanaikaisesti hiilidioksidin osapainetta. Hiilidioksidin avulla normalisointi mahdollistaa eri painoisten ihmisten tuloksien vertailun, mutta sen pitoisuus voi vaihdella paljon myös muista syistä. Joidenkin yhdisteiden pitoisuus saattaa olla suun kautta otetuissa näytteissä suurempi kuin nenän kautta otetuissa [22], mikä täytyy myös ottaa huomioon näytteenoton suunnittelussa. Tämä johtuu muun muassa suussa tapahtuvasta bakteeritoiminnasta [23].

Useimmiten hengitysnäytteet kerätään erilaisiin kanistereihin, pusseihin ja sorbentteihin (off-line) tai sitten ne analysoidaan ohjaamalla näyte suoraan analyysilaitteeseen (on-line). Off-line -määrittämisen haittapuoli on, että reaktiiviset ja vesiliukoiset molekyylit saattavat liueta pussin seinämille kondensoituneeseen veteen [24], minkä jälkeen niitä ei välttämättä saada enää mitattavaan muotoon ja osa näytteestä menetetään. Myös diffundoituminen näytepussin läpi tai adsorboituminen sen seinälle saat-

tavat lisätä näytehävikkiä. Off-line -näytteenottoa kannattaa siis käyttää vain silloin, kun on-line -näytteenotto ei ole mahdollinen eli esimerkiksi, jos laitetta ei voida kuljettaa potilaan luokse. Muutoin on-line -näytteenotto on suositeltavin tapa. Näytteenoksi voidaan ottaa yksi tai useampi uloshengityskerta. Useimmiten off-line -mittauksissa käytetään yhden hengityskerran tekniikkaa ja on-line -mittauksissa otetaan useamman hengityskerran keskiarvo tai tarkastellaan uloshengityksessä tapahtuvia muutoksia määrätyn ajan. Yksi hengityskerta ei välttämättä edusta todellista pitoisuutta, minkä vuoksi useamman hengityskerran keskiarvo on paras näytteenottotapa.

Näytteen keräyksessä on otettava huomioon myös eksogeenisten yhdisteiden aiheuttama kontaminaatio, sillä monet molekyylit esiintyvät myös sisäänhengitettyssä ilmassa. Näiden taustatasojen korjaamiseen ei ole yksiselitteistä tapaa, sillä siitä kuinka kauan ihmiselimistöllä kestää saavuttaa vakiotila ympäröivän ilman kanssa, ei ole yksityiskohtaista tietoa. Yksi tapa poistaa ympäröivän ilman aiheuttama kontaminaatio on hengittää puhdasta ilmaa muutamia minuutteja ennen näytteenottoa (engl. lung washout) [25]. Menetelmä vie kuitenkin aikaa ja on hankala, eikä siten sovi rutini-määrityksiin. Toisinaan voidaan mitata vain ennen hengitysnäytettä yhdisteen pitoisuus ympäröivästä ilmasta ja todeta, ettei pitoisuus ylitä haluttuja rajoja. Yhdisteen pitoisuus ympäröivässä ilmassa on kuitenkin määritettävä jokaisessa mittauksessa varmuuden vuoksi.

Myös hengityskondensaatin keräystä on ehdotettu näytteenottomenetelmäksi [26]. Sen kerääminen tehdään jäädyttämällä tai jäädyttämällä uloshengitysilmaa. Kondensaatissa olevat yhdisteet ovat peräisin mitä luultavimmin suusta, hengitysteistä ja keuhkorakkuloista, mutta näiden osuuksien tuottamien yhdisteiden määrät ovat vielä epäselviä. Hengityskondensaattia kerätessä oletetaan, että hengitysteiden nesteet muuttuvat aerosoleiksi turbulentin ilmapirran vaikutuksesta, minkä vuoksi kondensaatti edustaa hengitysteiden pinnalla olevia nesteitä. Hengityskondensaatin kerääminen on herättänyt mielenkiintoa suurien makromolekyylien, kuten proteiinien, lipidien ja nukleotidien, määrittämiseen. Vaikka suurin osa hengityskondensaatista on vettä, sisältää se myös näitä makromolekyylejä aerosoleina.

3.2 Analyytiset tekniikat

Hengitysanalyysissä käytetyimpiä tekniikoita ovat erilaiset massaspektrometriset menetelmät, kromatografiaan perustuvat menetelmät, elektroniset nenät ja sensorit ja laserspektroskopia. Myös näiden eri menetelmien yhdistelmiä on käytetty.

3.2.1 Massaspektrometriset ja kromatografiset tekniikat

Massaspektrometriassa erotellaan ja mitataan varattuja yhdisteitä niiden massan ja varauksen suhteen (engl. mass per charge ratio, m/z) perusteella [27]. Perinteinen massaspektrometri sisältää ionisaatiolähteen, massasuodattimen ja ilmaisimen. Ionisaatiolähde muuttaa kaasufaasissa olevat näytemolekyylit ionimuotoon. Syntyvien ionien määrä on verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen. Ionisaatiomenetelmiä on lukuisia erilaisia, kuten elektroni-ionisaatio (engl. electron impact ionization, EI), kemiallinen ionisaatio (engl. chemical ionization, CI), nopeilla atomeilla pommitus (engl. fast atom bombardment, FAB), kenttäionisaatio, sähkö- ja lämpösumutus.

Ionisaatiomenetelmän valinta riippuu tutkittavasta yhdisteestä. Esimerkiksi sähkösumutus-ionisaatio soveltuu ionisille yhdisteille, kun taas elektroni-ionisaatio on parempi lämmönkestäville ja haihtuville yhdisteille [27]. Ionisaatiomenetelmät voidaan jakaa niin sanottuihin pehmeisiin ja koviin ionisaatiomenetelmiin. Pehmeät ionisaatiomenetelmät pilkkovat ionisoitavia näytemolekyylejä vain vähän, kun taas kovat ionisaatiomenetelmät pilkkovat molekyylin lukuisiin osiin. Edellä mainituista tekniikoista kemiallinen ionisaatio on pehmeä menetelmä verrattuna esimerkiksi elektroni-ionisaatioon. Mitä useampaan osaan molekyyli pilkkoutuu, sen työläämpää massaspektrin tulkinta on.

Ionisaation jälkeen ionisoidut molekyylit erotellaan massan ja varauksen suhteen perusteella suodattimessa. Myös suodattimia on paljon erilaisia, joista käytetyimpiä ovat lentoaikasuodatin (engl. time-of-flight, TOF) ja kvadrupolisuo-datin (engl. quadrupole, QD) [27]. Lentoaikasuodattimessa ioneja kiihdytetään sähkökentässä ja aika, joka ioneilta kuluu ilmaisimen saavuttamiseen, mitataan. Aika riippuu ionin massan ja varauksen suhteesta. Kvadrupoli-massasuodatin puolestaan koostuu neljästä sauvasta, joista kahden vastakkain olevan sauvan jännitteet ovat vakioita ja kahden jännitettä

voidaan säätää. Ionit ohjataan sauvojen keskelle ja niiden lentorata sauvojen välissä riippuu ionin m/z -suhteesta ja säädettävästä jännitteestä. Jännitettä muunnellaan vähitellen siten, että jokainen m/z -suhde saapuu ilmaisimelle eri aikaan. Ilmaisimena voidaan käyttää elektroni- tai valomonistinputkia. Massaspektrometrin suodatin ja ilmaisimet vaativat lähes aina tyhjiön. Tyhjiön päätehtävänä on kasvattaa molekyylien välistä keskimääräistä vapaata matkaa.

Massaspektrometri voi toimia erillisenä mittalaitteena tai esimerkiksi erotussysteemin ilmaisimena. Se voi olla universaali tai selektiivinen ilmaisimena ja sen avulla voidaan saada sekä kvalitatiivista että kvantitatiivista tietoa näytteestä. Kvantitatiiviseen analyysiin vaaditaan kuitenkin kalibrointi tunnetuilla standardeilla. Näyte voidaan syöttää massaspektrometriin joko suoraan tai sumuttamalla kromatografisesta kolonnista [27]. GC-MS (engl. gas chromatography mass spectrometry) yhdistää kaasukromatografian ja massaspektrometrian hyvät ominaisuudet: kaasukromatografiassa näyte saadaan jaettua eri yhdisteryhmiä edustaviin osiin ja massaspektrometri antaa tietoa näistä osista. Tämä mahdollistaa yhdisteiden tunnistamisen monimutkaisista seoksista.

GC-MS on hengitysanalyysin vanhin ja käytetyin menetelmä. Se on samalla myös aikaavievin menetelmä. Kaasukromatografiassa näyte erotellaan eri yhdisteryhmiä edustaviin osiin kolonnissa [27]. Kolonnissa on tutkittavien yhdisteiden perusteella valittava stationäärifaasi ja kantajakaasuna toimiva liikkuva faasi. Erotus tapahtuu näytemolekyylin ja stationäärifaasin välisen vuorovaikutuksen avulla: mitä voimakkaammin näyte vuorovaikuttaa stationäärifaasin kanssa, sitä pidempään se pidättyy kolonnissa ja sen hitaammin se eluoituu kolonnista. Kaasukromatografia sopii parhaiten haihtuville ja lämmönkestäville yhdisteille.

Kaasukromatografian kolonnin loppupäästä erottuneet näytemolekyylit voidaan ohjata suoraan massaspektrometriin [27]. Lopullinen näytemolekyylien tunnistaminen tehdään siis kaasukromatografian eluutioaikojen ja massaspektrometrin lohkeamisten avulla. Tunnistaminen perustuu siihen, että kunkin yhdisteen lohkeaminen on aina samanlainen samoissa olosuhteissa. Massaspektristä nähdään ionien moolimassat. Mas-

massaspektreissä kunkin ionin suhteellinen osuus esitetään m/z -suhteen funktiona. Spektri normitetaan usein siten, että runsaimmin esiintyvän ionin intensiteetti on 100 ja muiden ionien intensiteetit suhteutetaan siihen. Syntyvien ionien määrä on verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen näytteessä.

Näytteensyöttö on kaasukromatografian ongelmallisimpia alueita [27]. Ennen kaasukromatografiaa hengitysnäytteet kerätään useimmiten kemialliseen, kryogeeniseen tai adsorptiiviseen loukkuun. Injektointi kolonniin voidaan tehdä usealla erilaisella tavalla ja injektointimenetelmän valinta riippuu monesta asiasta. Näytteen keräykseen puolestaan liittyy tarkkuus- ja toistettavuusongelmia. Toistettavimmaksi esikäsittelymenetelmäksi on osoittautunut kiinteäfaasimikrouutto (engl. solid phase microextraction, SPME) [28], jossa näyte konsentroidaan kuituun ja josta se voidaan esimerkiksi lämpödesorptiolla ohjata kaasukromatografian kolonniin. Sen etuna on muun muassa eri vaiheiden ja liuottimien vähäisyys, mikä säästää huomattavasti kustannuksia ja aikaa verrattuna muihin esikäsittelymenetelmiin. Kiinteäfaasimikrouuttoa käytettäessä on kuitenkin varmistuttava, että näyte irtoaa kuidusta ja on lämmönkestävä. Lämmönkestävyyttä vaaditaan, koska kaasukromatografian uunin lämpötila on korkea.

GC-MS ei sovellu reaaliaikaiseen hengityskomponenttien määrittämiseen (off-line tekniikka). Monet näytematriisit vaativat vielä kiinteäfaasimikrouuton lisäksi esikäsittelyä esimerkiksi johdoksen muodostuksen tai esikonsentroidon. Johdos muodostetaan esimerkiksi, jos yhdiste ei kestä lämpöä. GC-MS on herkkä menetelmä, sillä sen avulla voidaan mitata jopa ppt-pitoisuuksia. Uloshengitysilman suuri vesipitoisuus voi kuitenkin olla ongelma, sillä herkimmät kolonnit saattavat vaurioitua. GC-MS vaatii lisäksi säännöllisen kalibroinnin puhtaiden aineiden eluutioaikojen avulla. Menetelmä soveltuu lisäksi vain hyvin lämpöä kestäville suhteellisen poolittomille ja haihtuville yhdisteille.

Kun hengitysanalyysissä käytetään pelkkää massaspektrometriä erillisenä mitta-laitteena, suositetaan useimmiten pehmeitä ionisaatiomenetelmiä, joita ovat esimerkiksi kemialliseen ionisaatioon perustuvat tekniikat. Näin suurimmat GC-MS-menetelmän hankaluudet voidaan ratkaista. Hengitysanalyysissä yleisiä kemialliseen ionisaatioon

perustuvia massaspektrometrisiä menetelmiä ovat protoninsiirtoreaktio-massaspektrometri (engl. proton transfer reaction mass spectrometry, PTR-MS) ja valitun ionin seurantaan perustuva massaspektrometri (engl. selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS). Kaasukromatografian yhdistämistä SIFT-MS -menetelmään on myös kokeiltu [29]. SIFT-MS ja PTR-MS ovat melko uusia tekniikoita, jotka soveltuvat myös sellaisenaan ilman ja hengityksen reaaliaikaiseen määrittämiseen. Ne perustuvat reagenssi-ionien H_3O^+ , NO^+ ja O_2^+ aikaansaamaan kemialliseen ionisaatioon. SIFT-MS -menetelmän yksityiskohdista ja lääketieteellisistä sovelluksista kerrotaan tarkemmin muualla [30].

SIFT-MS +-menetelmässä kolmesta edellä mainitusta reagenssi-ionista yksi valitaan kvadrupoli-massasuodattimen avulla ja syötetään virtausreaktoriin [31]. Reaktorissa virtaa millibaarin paineessa heliumia, joka toimii kantajakaasuna. Valittu reagenssi-ioni ionisoi kantajakaasuun syötetyn hengitysnäytteen molekyylejä, jotka vievät reaktorin tilavuudesta vain muutamia prosentteja. Nämä ionisaation tuotteet tunnistetaan ja kvantifoidaan kvadrupoli-massaspektrometrillä. Reagenssi-ionin valinta riippuu näytteessä olevista yhdisteistä ja niiden tuottamista tuotteista reagenssi-ionin kanssa. Esimerkiksi helposti protonoituville yhdisteille valitaan useimmiten H_3O^+ , mistä kerrotaan myöhemmin PTR-MS -menetelmän yhteydessä. Kalibrointi on tehtävä joka laitteelle ja jokaiselle mitattavalle yhdisteelle erikseen.

H_3O^+ :n ollessa reagenssi-ionina tapahtuu protoninsiirtoreaktio. NO^+ ja O_2^+ ovat tässä mielessä erilaisia [31]. NO^+ :n ja näytteen välillä voi tapahtua ainakin kolmea erilaista reaktiotyyppiä: 1) varauksen vaihto, jolloin näytteestä muodostuu radikaalikaationi, 2) hydridin abstraktio ja 3) addukti-ionin muodostuminen. Varauksen siirto tapahtuu vain, jos näytteen ionisaatiopotentiaali on suurempi kuin typpimonoksidilla (esimerkiksi useimmat amiinit). Hydridin siirto tapahtuu useimmilla alkoholeilla ja aldehydeillä, kun taas adduktin muodostus useimmiten ketoneilla ja karboksyylihapoilla. O_2^+ -reagenssi puolestaan reagoi useimmiten varauksen siirron kautta, jolloin molekyylit hajoavat moneen osaan. Siksi O_2^+ on epäkäytännöllinen. Se on kuitenkin hyödyllinen pienten molekyylien, kuten typpimonoksidin ja ammoniakkin, määrittämisessä.

Sekä SIFT-MS että PTR-MS pystyvät erottamaan yhdisteet, joilla on sama moolimassa (esimerkiksi asetoni ja propanaali), kun käytetään eri reagenssi-ioneja. Veden konsentraatio hengitysilmassa on helppo laskea hydratoituneiden hydroniumionien signaaleista. Tämä toimii samalla näytteenottosysteemin sisäisenä kalibraationa [31], sillä absoluuttinen ulohengitysilman vesipitoisuus on aina noin 6 %. Reagenssi-ionit eivät kuitenkaan reagoi nopeasti ilman ja hengitysilman pääkomponenttien N_2 , O_2 , H_2O , CO_2 ja Ar kanssa. Lisäksi hydratoituneet reagenssi-ionit voivat edelleen toimia erillisinä reagenssi-ioneina muodostaen hydratoituneita tuotteita näytemolekyylien kanssa. Spektrin tulkinnassa myös nämä on otettava huomioon. Herkkyys määräytyy sekä SIFT-MS että PTR-MS -tekniikoissa sen mukaan, kuinka suuria reagenssi-ionien kertomanopeuksia voidaan havaita [31].

PTR-MS perustuu useimmiten protoninsiirtoreaktioon, jossa H_3O^+ protonoi näytemolekyylin reaktiokammiossa. Jos kaksi eri molekyyliä antavat protoninsiirtoreaktiossa saman m/z -suhteen, voidaan käyttää NO^+ ja O_2^+ -reagenssi-ioneja, kuten SIFT-MS -menetelmässä. Protoninsiirtoreaktio on pehmeä ionisaatiomenetelmä, mikä johtuu siitä, että protoninsiirtoreaktio on vain lievästi eksoterminen. Lohkeamaton tuoteioni havaitaan siis massaspektrissä massa-varaussuhteella, joka vastaa yhden atomimassayksikön verran suurempaa moolimassaa kuin alkuperäinen molekyyli. Jos molekyylissä on kuitenkin esimerkiksi fluoriatomi, tapahtuu lohkeaminen, jossa vapautuu vetyfluoridia. Myös kokonainen tai osittainen lohkeaminen tapahtuu joillakin alkoholeilla, aldehydeillä ja estereillä. [31]

Yhdisteiden kvantifiointi perustuu protoninsiirtoreaktion kinetiikkaan:

$$\frac{d}{dt}[\text{MH}^+] = k_M[\text{M}][\text{H}_3\text{O}^+], \quad (5)$$

missä M on tutkittava yhdiste ja k_M tälle yhdisteelle ominainen nopeuskerroin [32]. Kvantifiointi vaatii siis, että yhdisteen nopeuskerroin tunnetaan, mikä puolestaan vaatii yhdisteen tuntemisen. Toisinaan voidaan käyttää yhtä nopeuskerrointa kaikille yhdisteille, mutta tällöin kvantitatiivisuus kärsii. PTR-MS ja SIFT-MS -menetelmien etuja ovat reaaliaikaisen mittaamisen mahdollisuus jopa hengityssykliä pienemmällä

erotuskyvyllä ja määritysrajat ovat jopa ppt-tasoa riippuen mittausajasta [33].

PTR-MS -menetelmän keskimääräinen herkkyys (ppt) on parempi kuin SIFT-MS -menetelmän (ppb) [31]. Tämä johtuu siitä, että PTR-MS käyttää kantajakaasuna näytekäasua ja samaa painetta kuin SIFT-MS. Siksi näyte ei laimene ja se vie reaktorin tilavuudesta suuremman osan kuin SIFT-MS -menetelmässä. Lisäksi, jos käytetään vain hydroniumionia reagenssi-ionina, ei tarvita massasuodatinta reagenssi-ionin valitsemiseen ja voidaan kasvattaa reagenssi-ionien virtausnopeutta ja herkkyys paranee. Myös reaktorin pitkittäisen sähkökentän vuoksi pienempi osa reagenssi-ionista menetetään reaktorin seinämille kuin SIFT-MS -menetelmässä. PTR-MS -menetelmän etuna on myös se, että protonaation tapahduttua kerran, reaktio takaisin hydroniumioniksi ja alkuperäiseksi molekyyliksi ei useimmiten ole mahdollinen. Syynä tähän on se, että lähes kaikkien haihtuvien yhdisteiden protoniaffiniteetti on suurempi kuin veden. On joitakin yhdisteitä, kuten formaldehydi ja vetysyanidi, joiden protoniaffiniteetti on lähellä vettä, minkä vuoksi reaktio takaisin alkuperäiseksi yhdisteeksi on mahdollinen. [32]

3.2.2 Ioniliikkuvuusspektrometria, IMS

Ioniliikkuvuusspektrometriassa (engl. ion mobility spectrometry, IMS) tutkitaan ionisoitujen näytemolekyylien liikkuvuutta [32]. Näytemolekyylit ionisoidaan yleensä törmäyttämällä niitä radioaktiivisessa lähteessä (esimerkiksi ^{63}Ni) muodostettujen ionien kanssa. Positiivinen ionisaatio tapahtuu protoninsiirtoreaktiossa ja negatiivinen joko elektroninsiippauksessa tai reaktiossa O_2^- :n kanssa. Siten ionisaatio tapahtuu näytemolekyylien protoniaffiniteetin ollessa riittävän suurina eli kevyitä alkaaneja ei voida määrittää. Näytemolekyylejä vastaavat ionit liikkuvat ilmanpaineessa heikon sähkökentän vaikutuksesta. Sähkökentässä erilaiset ionit kasautuvat yhteen ja erottuvat avaruudellisesti ja ajallisesti riippuen yhdisteen massasta ja geometriasta. Näiden erilaisten ionien kasautumien kulkuajat mitataan.

IMS -menetelmän etuna on sen kyky erottaa isomeerejä, suuri herkkyys, nopeus, kompakti koko ja melko alhaiset käyttökulut. Yhden spektrin mittaaminen kestää ai-

noastaan muutamia kymmeniä millisekunteja [32]. Haittana on kuitenkin, että se soveltuu huonosti tuntemattomien yhdisteiden määrittämiseen, koska ioni-molekyylireaktiot ovat monimutkaisia ja menetelmän massaresoluutio on melko huono. IMS voidaan toisaalta yhdistää kaasukromatografian kolonneihin tai SIFT-MS -laitteeseen auttamaan yhdisteiden tunnistuksessa. Menetelmällä on esimerkiksi tutkittu *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin infektoimien ihmisten uloshengitysilmaa [34].

3.2.3 Elektroniset sensorit

Elektronisten sensorien ero edellä mainittuihin laitteisiin on se, että mittaustulos ilmoitetaan joukkoina samankaltaisia yhdisteitä, eikä niinkään listana erilaisia yhdisteitä ja niiden konsentraatioita. Niiden mahdollisina etuina hengitysanalyysin kannalta mainittakoon halpuus, nopeus ja helppokäyttöisyys [18]. Elektronisia sensoreita on monia erilaisia, kuten metallioksidisensorit, kvartsikide- tai akustiset sensorit ja johtavat polymeerisensorit [35]. Metallioksidisensoreissa eli puolijohdesensoreissa metalli on kerrostettu keraamiseen pohjaan. Lämmitetty sensori reagoi näytteen kanssa vapauttaen elektroneja, jotka johtavat sähköä ja laskevat sensorin resistanssia. Nämä sensorit ovat hyvin herkkiä, kestäviä ja resistentteja kosteudelle ja ikääntymiselle mutta epäselektiivisiä. Niiden selektiivisyyttä voidaan muuttaa käyttämällä erilaisia määriä jalometalleja tai vaihtamalla toimintalämpötilaa.

Kvartsisensorit koostuvat puolestaan päällystetyistä tai päällystämättömistä kvartsilävyistä, joiden värähdystaajuus muuttuu altistettaessa näytteelle [35]. Värähdystaajuuden muutos on verrannollinen tutkittavan yhdisteen massa- ja selektiivisyys riippuu päällysteen paksuudesta. Johtavat polymeerit ovat muoveja, jotka johtavat sähköä (esimerkiksi polypyrroli). Tutkittavana olevat haihtuvat yhdisteet kiinnittyvät polymeerin pintaan muuttaen resistanssia. On myös olemassa optisia sensoreita, joissa näyte virittyy valon vaikutuksesta ja siitä aiheutuvaa reflektanssia, fluoresenssia tai kemiluminesenssia mitataan. Sähkökemialliset sensorit puolestaan sisältävät elektrodin ja elektrolyyttiliuoksen. Niiden vaste riippuu työelektrodilla hapetettavan tai pelkistettävän molekyylin sähkökemiallisista ominaisuuksista.

Sensorikokonaisuudessa on yleensä rivi useita sensoreita, jotka reagoivat erilais-

ten yhdisteryhmien kanssa osittain limittäisillä herkkyyksillä [18]. Kaikkien sensorien toiminta perustuu kolmeen vaiheeseen: tutkittava kaasu kulkeutuu sensoririvin yli, sensorin jokin fysikaalinen ominaisuus muuttuu ja syntyy signaali [35]. Näyte on saatettava sensorille oikeassa muodossa, jotta tutkittavien yhdisteiden vuorovaikutus sensoririvin kanssa olisi optimaalista. Näyte täytyy siis tuoda sensorille aina samalla tavalla, jotta kosteus, lämpötila ja näytteen koko on standardisoitu tulosten vertailemiseksi.

Sensoreita on sovellettu runsaasti mikrobiologisten infektioiden määrittämisessä [35]. Mikro-organismien erittämien haihtuvien yhdisteiden laatuun ja määrään vaikuttavat tutkittavan viljelmän tyyppi ja ikä sekä laji. Tavanomaiset bakteeriviljelmämenetelmät kestävät 24 - 48 tuntia, minkä vuoksi elektronisten nenien kehittäminen on ollut tarpeen. Elektronisten nenien käyttöä on ehdotettu muun muassa erottamaan erilaiset taudinaiheuttajat toisistaan [36]. Tämä tutkimus pohjautui terpeenien, trimetyyliamiinien ja ketonien tuotantoon. Elektronisia neniä on käytetty myös muiden kuin infektiosairauksien määrittämisessä. Esimerkiksi eräässä tutkimuksessa onnistuttiin tunnistamaan kaikki keuhkosityöpää sairastavat ja 94 % kontrolleista mittaamalla hengityksessä olevia alkaaneja ja aromaattisia yhdisteitä. [37] Myös diabeteksen määrittämiseksi on ehdotettu silikoniin päällystettyä tinadioksidi-sensoria, joka on erittäin selektiivinen asetonille [38].

3.2.4 Laserspektroskopia

Yksinkertainen laserspektroskopinen systeemi sisältää näytekyvetin, jonka läpi herätesäteilynä toimiva lasersäde johdetaan, ja ilmaisimen, joka mittaa näytteen läpäisseen lasersäteen intensiteetin muutoksia. Lasereita käytetään herätesäteilynä niiden monokromaattisuuden ja koherenttiuden vuoksi. Säteilyn absorptio molekyylin johtuu useasta eri ilmiöstä [15]. Molekyylin kokonaisenergia koostuu elektronisesta, värähdys-, pyörimis- ja etenemisenergioista. Jokaisella molekyylillä on sille ominainen spektri eli niin sanottu sormenjälki, jota voidaan käyttää molekyylin tunnistamiseen ja pitoisuuden määrittämiseen näytteestä. Spektri kuvataan tavallisesti säteilyn intensiteettinä aallonpituuden funktiona.

Valo eli sähkömagneettinen säteily on aaltoliikettä. Sähkömagneettinen spektri voidaan jakaa osiin säteilyn ja aineen vuorovaikutuksien perusteella [15]. Se muodostaa näistä spektrialueista koostuvan jatkumon, joka on koottu taulukkoon 1. Sähkömagneettinen spektri jaotellaan erilaisiin osiin lähinnä siksi, että osittelulla halutaan ilmaista, että eri alueissa tapahtuu erilaisia vuorovaikutuksia aineen ja säteilyn välillä. Laser-valon aallonpituuden ollessa infrapuna-alueella tarkastellaan molekyylien värähdys- ja pyörimissiirtymiä, joita tutkitaan laserabsorptiospektroskopiassa. Infrapuna-alue jaetaan vielä kauko-, keski- ja lähi-infrapuna-alueisiin. Näkyvän valon ja ultraviolettivalon alueella nähdään puolestaan elektronien virittymistä. Mikroaaltoalueella tapahtuvat molekyylien pyörimiset.

Säteilytyyppi	Aallonpituus / m	Taajuus / Hz	Vuorovaikutusmekanismi aineen kanssa
Radioaallot	$10^{10} - 10^0$	$1 - 10^8$	Ydinmagnetismi (NMR)
Mikroaallot	$10^0 - 10^{-3}$	$10^8 - 10^{13}$	Molekyylien pyöriminen
Infrapunasäteily	Kauko-IR: 1 mm - 100 μm , Keski-IR: 100 μm - 10 μm , Lähi-IR: 10 μm - 1 μm	$10^{13} - 10^{14}$	Molekyylien värähtelyt
Näkyvä valo	700 - 400 nm	noin 10^{15}	Valenssielektronien virittyminen
Ultraviolettisäteily	$10^{-6} - 10^{-8}$	10^{15}	Valosähköinen ilmiö, molekyylien ja atomien valenssielektronien virittyminen
Röntgensäteily	$10^{-8} - 10^{-11}$	$10^{16} - 10^{20}$	Sisempien elektronien irtoaminen ja virittyminen
Gammasäteily	$10^{-11} - 10^{-16}$	$10^{20} -$	Atomien ytimien virittyminen, raskasmetallien sisempien elektronien irtoaminen

Taulukko 1: Sähkömagneettisen spektrin säteilytyypit, aallonpituusalueet, taajuudet ja vuorovaikutusmekanismit aineen kanssa eri alueilla [15].

Kun näytteeseen kohdistetaan infrapunasäteilyä, säteily absorboituu näytteeseen molekyylien kvantittuneiden värähdysenergiatilojen kautta. Säteilyn taajuuden ν (yksikkö Hz) ja aallonpituuden λ (yksikkö nm) välillä on yhteys:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}, \quad (6)$$

missä c on valon nopeus. Aallonpituutta vielä yleisempi yksikkö spektroskopiassa on aaltoluku (yksikkö cm^{-1}), joka on kääntäen verrannollinen aallonpituuteen:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (7)$$

Valofotoni, jonka energia määräytyy yhtälöstä

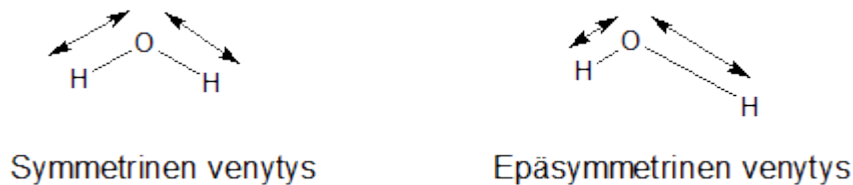
$$E = h\nu, \quad (8)$$

missä h on Planckin vakio, absorboituu näytteeseen siis silloin, kun energia E vastaa molekyylin kvantittuneiden värähdystilojen välistä energiaa.

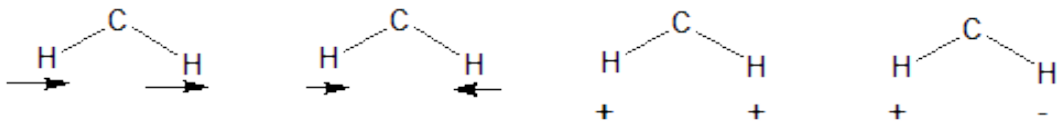
Värähtelevän molekyylin sidoksia kuvataan usein värähtelevinä jousina, joiden voimavakio kuvastaa sidoksen voimakkuutta [15]. Mitä vahvempi sidos ja suurempi voimavakio, sitä enemmän sidos vaatii energiaa värähdelläkseen ja sitä lyhyempiä aallonpituuksia tarvitaan yhtälöiden (6) ja (8) mukaisesti. Huoneenlämmössä suurin osa molekyyleistä on perusvärähdystilalla. Perusvärähdykset tapahtuvat keski-infrapuna-alueella. Todennäköisimpien perusvärähdyksien lisäksi pienellä todennäköisyydellä tapahtuu myös heikkoja ylivärähdyksiä ja kombinaatiovärähdyksiä lähi-infrapuna-alueella ($>4000 \text{ cm}^{-1}$). Kombinaatiovyöt syntyvät, kun useampi molekyylin värähdys tapahtuu samaan aikaan. Kaukoinfrapuna-alueella tutkitaan esimerkiksi metallikompleksien värähdyksiä sekä joidenkin molekyylien pyörimisliikkeitä.

Molekyylit ovat huoneenlämmössä jatkuvassa liikkeessä. Värähdysliikkeiksi luetaan molekyylissä olevien atomien välisten sidosten venytykset ja kulmataivutukset. Kuvassa 4 on kuvattu vesimolekyylin sidosten symmetrinen ja epäsymmetrinen venytys [39]. Kuvassa 5 puolestaan on C-H-ryhmän kulmataivutukset [39]. Jokainen värähdysliike vastaa tiettyä absorptiopiikkiä molekyylin infrapunaspektrissä. N-atomisella molekyylillä on yhteensä $3N$ kappaletta värähdys-, pyörimis- ja etenemismoodeja, jotka vastaavat siis jokaisen molekyylissä olevan atomin karteesisia koordinaatteja. Epälineaarisisessa molekyylissä näistä kolme vastaa pyörimisiä ja kolme etenemisliikettä.

Lineaarisella molekyylillä puolestaan kolme vapausastetta liittyy etenemisliikkeeseen ja 2 pyörimiseen. Siksi lineaarisella molekyylillä on yhteensä $3N-5$ perusvärähdystä ja epälineaarisella $3N-6$. Kuvan 4 epälineaarisessa vesimolekyylissä on kolme atomia ja siten $3 \times 3 - 6 = 3$ värähdymoodia. Kuvan 4 venytysvärähdysten lisäksi veden H-O-H-sidokulma voi muuttua, mikä on kolmas näistä veden värähdysmoodeista.



Kuva 4: Vesimolekyylin symmetrinen ja epäsymmetrinen venytys.



Kuva 5: CH-ryhmän kulmataivutukset, missä + tarkoittaa taivutusta katsojaan päin ja - katsojasta poispäin.

Molekyylin on infrapuna-aktiivinen silloin, kun sen dipolimomentissa tapahtuu värähdysten aikana muutos [15]. Dipolimomentti on vektorisuure ja riippuu siksi molekyylin asennosta. Heteronukleaarisessa kaksiatomisessa molekyylissä elektronit ovat jakautuneet epätasaisesti atomien välille elektronegatiivisuuseron vuoksi. Sidosvenytyksessä elektronijakauma ja siten dipolimomentti muuttuvat. Kaksiatomisia homonukleaarisia molekyylejä, kuten happea tai typpeä, ei puolestaan voida tunnistaa tavanomaisella IR-spektroskopiolla.

Näytemolekyylin tunnistaminen eli kvalitatiivinen analyysi tehdään esimerkiksi erilaisten molekyylissä olevien funktionaalisten ryhmien ominaisten värähdysten avulla. Monesti apuna käytetään erilaisia spektrikirjastoja tai laskennallisia malleja, joita verrataan näytespektriin. Kvantitatiivisessa analyysissä käytetään puolestaan Lambertin ja Beerin lakia:

$$T(L, \tilde{\nu}) = \frac{I(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})} = e^{-\alpha(\tilde{\nu})L}, \quad (9)$$

missä $T(L, \tilde{\nu})$ on transmittanssi (yksikötön), $I_0(\tilde{\nu})$ on herätesäteilyn intensiteetti ennen näytettä, $I(\tilde{\nu})$ on säteilyn intensiteetti näytteen läpäisyn jälkeen, $\alpha(\tilde{\nu})$ on absorptiokerroin (yksikkö cm^{-1}) ja L näytteen paksuus (yksikkö cm) [15]. Intensiteetti ja absorptiokerroin riippuvat herätesäteilyn aallonpituudesta ja siten aaltoluvusta. Absorptiokerroin voidaan liittää molekyylin absorptiopoikkipinta-alaan $\sigma(\nu)$ (yksikkö $\text{cm}^2/\text{molekyyli}$) yhtälöllä:

$$\alpha(\tilde{\nu}) = \sigma(\tilde{\nu})n, \quad (10)$$

missä n on näytteen konsentraatio.

Transmittanssin sijaan käytetään myös absorbanssia A (yksikötön), joka on suoraan verrannollinen yhdisteen pitoisuuteen:

$$A = \log \frac{1}{T(L, \tilde{\nu})} = \frac{\alpha(\tilde{\nu})L}{\ln 10} = nL \int_0^\infty \sigma(\nu) d\nu = SnL, \quad (11)$$

missä S on viivan voimakkuus (yksikkö $\text{cm}^{-1}/(\text{molekyyli cm}^{-2})$) ja integrointi suoritetaan koko absorptioviivan yli. Yhtälöstä (11) nähdään, että mitä voimakkaampi siirtymä, sitä alhaisempia konsentraatioita voidaan määrittää. Herkkyyttä voidaan parantaa myös kasvattamalla signaali-kohinasuhdetta ja absorptiomatkaa. Vahvimmat absorptioviivat sijaitsevat yleensä keski-infrapuna-alueella, mutta tällä alueella laserlähteissä ja optiikassa on usein puutteita. Absorptiomatkaa voidaan kasvattaa joko pidentämällä näytekyvettä tai heijastamalla herätesäteily useita kertoja näytteen läpi. [40] Jos näytteessä on monia absorboivia yhdisteitä, kokonaisabsorbanssi määritetään kaikkien yhdisteiden absorbanssien summana.

Joissakin tapauksissa voidaan käyttää myös niin sanottuja epäsuoria absorp-

tiotekniikoita, kuten esimerkiksi lasersäteilyn virittämää fluoresenssia (engl. laser induced fluorescence, LIF) tai valoakustista spektroskopiaa (engl. photoacoustic spectroscopy, PAS). Tärkeimpiä laserspektroskooppisia tekniikoita hengitysanalyysin kannalta ovat kuitenkin muun muassa TDLAS, CRDS, ICOS, CEAS, CALOS ja OFC-CEAS [41]. Näistä TDLAS (engl. tunable diode laser absorption spectroscopy) yhdistää perinteiseen absorptiospektroskopiaan säädettävät diodilaserit, joiden aallonpituutta säädetään näytekaasun absorptioviivan yli. Ontelovaimenemisspektroskopia (engl. cavity ring-down spectroscopy, CRDS) on ontelovahvisteinen muunnos normaalista laserabsorptiospektroskopiasta ja siitä kerrotaan tarkemmin seuraavassa kappaleessa. ICOS (engl. integrated cavity output spectroscopy), CEAS (engl. cavity enhanced absorption spectroscopy) ja CALOS (engl. cavity leak-out absorption spectroscopy) ovat muunnoksia ontelovaimenemisspektroskopiasta hieman eri nimityksillä. OFC-CEAS (engl. optical frequency comb cavity enhanced absorption spectroscopy) yhdistää ontelovahvisteiseen spektroskopiaan optisen taajuuskamman, joka sopii laajemman spektrialueen määrittämiseen [41].

Laserspektroskopian etuna on suuri herkkyys yhdisteille, jotka esiintyvät hengityksessä pieninä pitoisuuksina (jopa pptv). Lisäksi sen avulla voidaan reaaliaikaisesti mitata uloshengitysilmaa, ja laitteista voidaan tehdä kannettavan kokoisia. Myöskään aikaa vievää näytteen esikäsittelyä ei tarvita, vaan kaasumainen näyte voidaan ohjata suoraan laitteeseen (on-line). Aikaa säästyy myös siksi, että suurin osa laserspektroskooppisista menetelmistä ei vaadi kalibrointia jokaista mittausta varten. Ongelmia voivat kuitenkin tuottaa hengitysilman suuret vesipitoisuudet varsinkin, jos veden absorptiovyö on päällekkäin määritettävän yhdisteen absorptiovyön kanssa. Eduksi voidaan ajatella myös se, että laserspektroskopiassa hengitysnäyte ei tuhoudu, kuten esimerkiksi massaspektrometrisissä menetelmissä. Siten näyte voitaisiin ohjata mittauksen jälkeen toiseen laitteeseen analysoitavaksi.

Haittapuolena voidaan mainita, että laserspektroskopia sopii ainoastaan melko pienille molekyyileille (vertaa GC-MS), sillä isojen molekyylien absorptiovyöt ovat niin leveitä, että yksittäisiä molekyyliä on vaikea tunnistaa niistä. Isojen molekyylien seospektrejä on usein vaikea tulkita, minkä vuoksi niitä voidaan mitata lähinnä vain kvali-

tatiivisesti. Suurien molekyylien spektrit ovat monimutkaisia, koska molekyylien koon kasvaessa värähdysvapausasteiden lukumäärä kasvaa. Kun värähdysvapausasteita on paljon, niitä vastaavat spektriviivat sulautuvat vaikeasti erotettavaksi yhdeksi leveäksi vyöksi ja tunnistaminen ja pitoisuuden määrittäminen hankaloituvat.

Laserspektroskopia on vielä melko uusi menetelmä hengitysanalyysin käytössä, ja sen kehittäminen sairaalakäyttöön sopivaksi vaatii yhteistyötä spektroskopistien, insinöörien ja lääkäreiden kanssa. Sen haasteita ovat esimerkiksi laitteiden hinnat ja spektriviivojen päällekkäisyydet. Monet valonlähteet ovat kalliita. Lähi-infrapuna-alueella toimivat diodilaserit ovat edullisia, mutta tällä spektrialueella on lähinnä vain heikkoja molekyylien ylivärähdyksiä. Toisaalta MIR-alueen laserit ovat kalliita, eivätkä sovellu vielä kenttätutkimuksiin. Kvanttikaskadilaserit ovat vieneet kehitystä eteenpäin, koska ne ovat pienikokoisia ja edullisia, vaikkakin niihin pohjautuvat sensorit ovat vielä liian kalliita kenttätutkimuksiin. Laitteen hankinnan jälkeiset ylläpitokustannukset ovat kuitenkin melko edullisia verrattuna esimerkiksi kaasukromatografiaan. Spektriviivojen päällekkäisyydet voidaan usein välttää valitsemalla tutkittavan yhdisteen tunnistamiseen käytettävä absorptiovyö oikein.

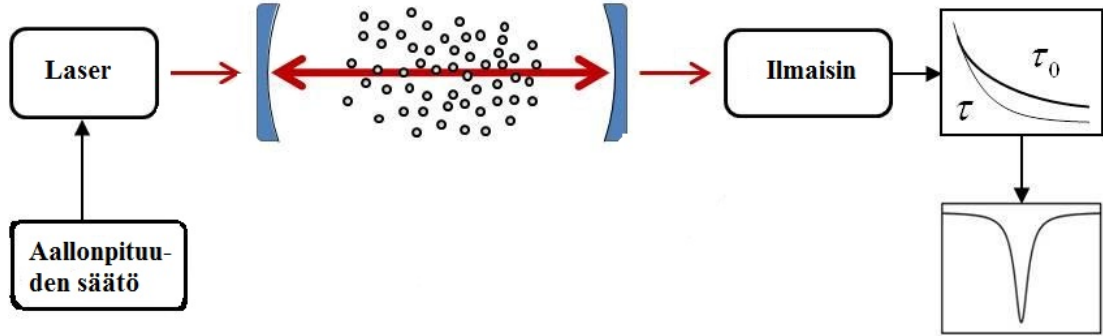
3.2.5 Ontelovaimenemisspektroskopia, CRDS

Ontelovaimenemisspektroskopiassa (engl. cavity ring-down spectroscopy, CRDS) [41] tarkastellaan herätesäteilynä toimivan lasersäteen intensiteettiä ajan funktiona. Kaasumainen näyte suljetaan onteloon, jonka päissä on erittäin voimakkaasti heijastavat peilit, joiden heijastavuus on tyypillisesti vähintään 99,9 %. Lasersäde johdetaan onteloon toisen peilin läpi. Joutuessaan vastakkaisessa päissä olevalle peilille säde heijastuu takaisin lukuisia kertoja peilien välillä. Lasersäteen intensiteetin eksponentiaalista vaimenemista peilien välillä voidaan kuvata yhtälön (12) mukaisesti:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (12)$$

missä t on aika, τ aikavakio, $I(t)$ intensiteetti ja I_0 herätesäteilyn intensiteetti. Vaimenemisaika τ kuvaa aikaa, jolloin laserin intensiteetti on pudonnut $\frac{1}{e}$ -osaan alkuperäisestä.

Tällaisella ontelovahvisteisella menetelmällä saadaan kasvatettua absorptiomatkan pituutta jopa kilometreihin. Ontelovaimenemisspektroskopian yksinkertaistettu periaate on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6: Ontelovaimenemisspektroskopian peruseriaate.

Lasersäteen intensiteetin heikkenemisen ontelossa määräävät häviöt, jotka johtuvat esimerkiksi peilien äärellisestä heijastavuudesta, optisesta absorptiosta ja siroonnasta [41]. Absorptiospektri saadaan säätämällä laserin aallonpituutta ja mittaamalla valon intensiteetin vaimenemisaikaa jokaisella aallonpituudella näytteen ollessa ontelossa. Tyhjän ontelon vaimenemisaika τ_0 määritellään yhtälöllä:

$$\tau_0 = \frac{L}{c(1 - R)}, \quad (13)$$

missä L on ontelon pituus, c valonnopeus ja R peilien heijastavuus. Kun ontelossa on kaasumainen näyte, valon intensiteetti vaimenee nopeammin absorptioon vuoksi ja vaimenemisaika saadaan yhtälöstä:

$$\tau = \frac{1}{c(1 - R + \sigma(\tilde{\nu})nL)}, \quad (14)$$

missä $\sigma(\tilde{\nu})n$ on yhtälön (10) absorptiokerroin. Kokeellisesti mitataan siis vaimenemisaikaa ilman absorptiota ja absorptioon kanssa. Absorptiokerroin saadaan yhtälöstä:

$$\alpha = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right) \quad (15)$$

Edellä selitetty kuva CRD-spektroskopiasta (niin sanottu ”pulssitettu kuva”) on hieman yksinkertaistettu, sillä siitä saa käsityksen, ettei laserin taajuudella ole merkitystä. Se ei nimittäin huomioi laservalon interferenssiä ontelossa. Lasersäteen täytyy kulkea ontelossa siten, että se muodostaa onteloon seisovan aallon [41]. Ihanteellinen tilanne saavutetaan silloin, kun laservalo heijastuu ontelossa peilien välillä siten, että peräkkäisten aaltojen solmukohta osuu peileille ja tällöin lasersäteiden intensiteetti kasvaa. Puhutaan niin sanotusta vahvistavasta interferenssistä. Seisovan aallon edellytyksenä on, että ontelon pituus on aallonpituuden puolikkaan monikerta:

$$L = \frac{\lambda}{2}n, \quad (16)$$

missä L on ontelon pituus, λ aallonpituus ja n kokonaisluku. Jos yhtälö (16) ei toteudu, aallonpituudet vaimentavat toisiaan ja intensiteetti heikkenee.

Ontelon moodit saattavat aiheuttaa ongelmia, jos hyvin kapea absorptio on ontelon moodien välissä, jolloin se puuttuu mitattavasta spektristä. Ontelossa on sekä pitkittäis- että poikittaismoodia. Pitkittäismoodien väli eli niin sanottu vapaa spektrialue (engl. free spectral range, FSR) määräytyy yhtälöstä:

$$\text{FSR} = \Delta\nu = \frac{c}{2L}, \quad (17)$$

missä c on valon nopeus ja L ontelon pituus. Siten ontelossa säilyvät vain ne moodit, jotka vastaavat ontelon moodia.

Niin sanottu TEM₀₀-poikittaismoodi on poikkileikkaukseltaan Gaussin funktion

muotoinen. Korkeamman kertaluvun poikittaisia moodeja merkitään symbolilla TEM_{nm} , jossa alaindeksi n viittaa radiaalisiin solmukohtiin ja m kulmallisiin solmukohtiin. Kun poikittaismoodien suhde pitkittäismoodeihin on irrationaalinen, saavuttaa ontelon moodirakenne jatkumon. Jokainen virittynyt moodi vaimenee ontelossa omalla nopeudellaan ja jokaiseen moodiin liittyvä valonsäde vaikuttaa interferenssiin. Poikittaismoodien virittymistä voidaan vähentää moodisovituksella eli muokkaamalla lasersädettä ennen onteloa siten, että sen koko ja säde ovat lähellä ontelon TEM_{00} -moodeja [42].

CRDS on suora absorptiotekniikka, joka mittaa absorptiota absoluuttisessa mittaavassa ja on epäherkkä valonlähteen intensiteetin vaihteluille. Pitkät laserin ja näytteen väliset vuorovaikutusmatkat mahdollistavat vahvojen siirtymien mittaamisen erittäin pienillä pitoisuuksilla tai heikkojen siirtymien mittaamisen. CRDS-laite on kohtuullisen helppo rakentaa ja sitä voidaan soveltaa UV-alueelta IR-alueelle, kunhan peilien heijastavuus on riittävä, ilmaisimen vasteaika lyhyt ja lasereita on saatavilla. Herkkyyttä voidaan parantaa hankkimalla entistä paremmin heijastavat peilit, sillä, mitä parempi heijastavuus peileissä on, sitä pidempi vuorovaikutusmatka lasersäteeseen ja näytemolekyylien välillä on. Ontelovaimenemisspektroskopian heikkoudet hengitysanalytiikassa ovat suunnilleen samoja kuin aiemmin laserspektroskopiassa mainitut.

Taulukossa 2 on vielä vertailtu eri menetelmiä. Siitä voidaan huomata, että jokaisella menetelmällä on omat heikkoutensa ja vahvuutensa. Hengitysanalyysin kannalta paras laite on herkkä, edullinen, kannettava, helppokäyttöinen sekä sopii reaaliaikaiseen ja on-line mittaamiseen kaikille yhdisteille. Vaatimukset ovat siis melko kattavat, eikä näitä kaikkia ominaisuuksia täyttävää laitetta välttämättä ole mahdollista edes kehittää. Erilaisten laitteiden voidaan kuitenkin ajatella täydentävän toisiaan - jokainen omilla hyvillä ominaisuuksillaan. Seuraavassa kappaleessa esitellään joitakin yleisiä hengitystestejä, joista osa jollakin tavalla soveltaa edellä kuvattuja laitteistoja.

4 Kliinisiä hengitystestejä

Hengitysanalyysiin liittyviä julkaisuja on lukuisia, mutta vain muutamat hengitysilman testit ovat vakiintuneessa käytössä. Hengitystestit voidaan jakaa kahteen luok-

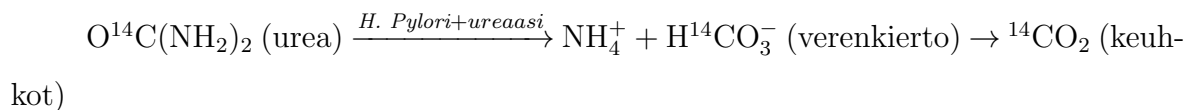
Menetelmä	Mittausaika	Määrittäysraja	Näytteenotto	Soveltuvuus	Edut	Haitat
GC-MS	Korkeimmillaan jopa useita tunteja	ppt	Erilaiset loukut, off-line	Kaikki haihtuvat ja termostabiilit yhdisteet, noin 20 % orgaanisista yhdisteistä	Yhdistää GC:n ja massaspektrometrian edut, sopii suurillekin molekyyleille, monikomponenttianalyysi	Kallis, hidas, ongelmat kolonnien kanssa, suuria laitteita, vaatii kalibroinnin
SIFT-MS	Reaaliaikainen	ppb	On-line tai off-line	Pienet ja keski-koiset molekyylit	isobaaristen ja iso-meristen yhdisteiden tunnistus mahdollinen, monikomponenttianalyysi	suuria laitteita, kallis, spektrin tulkin- ta, kalibroitava,
PTR-MS	Reaaliaikainen	ppt	On-line tai off-line	Pienet ja keski-koiset molekyylit	Sopii lukuisille yhdisteille, herkkyys, monikomponenttianalyysi	Kallis, reaktio ta- kaisin neutraaliksi yhdisteeksi mah- dollinen, spektrin tulkinta, suuria laitteita, kalibroiva
IMS	Nopea (muutamia sekunteja)	ppb	On-line tai off-line	Kaikki näytetyypit: neste, kiinteä, kaasu	Nopeus, helppous, monikomponenttianalyysi	Epäselektiivisyys
Sensorit	Riippuu sensorista	Riippuu sensorista	Näyte tuotava sensorille aina samalla tavalla ja oikeassa muodossa	Riippuu sensorista	Edullisia, nopeita	Epäselektiivisyys
Laserspektroskopia	reaaliaikainen	ppt	On-line tai off-line	Molekyylit, joilla värähdyssiirtymä tutkittavalla spektrialueella, ei suurille molekyyleille	Kvantitatiivinen, selektiivinen, kannettavia malleja on jo olemassa	Sopii vain melko pienille yhdisteille ja vain muutamalle yhdisteelle ker- rallaan, absorptiospektri tunnettava

Taulukko 2: Analyttisten menetelmien vertailua.

kaan: 1) kokeet, joissa mitataan jonkin merkkiaineen vaikutusta elimistöön ja siten uloshengitysilmaan ja 2) kokeet, joissa mitataan elimistön normaalin tai epänormaalin fysiologian seurauksena hengitykseen erittyviä yhdisteitä. Merkkiaineen seurauksena uloshengitykseen erittyvä yhdiste voidaan tunnistaa esimerkiksi käyttämällä isotooppimerkittyä yhdistettä, mutta edellytyksenä on, että merkkiaineen aineenvaihdunta ja erittymismekanismi tunnetaan tarkasti. Toisinaan myös esimerkiksi veren, virtsan tai bakteeriviljelmien yläpuolinen höyrytila-analyysi (engl. headspace) tai ihon erittämien kaasujen mittaaminen luokitellaan hengitysanalyysiksi.

Biomerkkiaine määritellään veressä, muissa kehon nesteissä tai kudoksissa olevaksi molekyyliksi, joka on merkki normaalista tai epänormaalista prosessista, tilasta tai sairaudesta [43]. Biomerkkiaineen avulla voidaan seurata, kuinka hyvin keho vastaa sairauden tai tilan hoitoon. Sitä voidaan kutsua myös molekyylimarkkeriksi tai merkkimolekyyliksi. Vuoteen 2007 mennessä hyväksytyjä uloshengityksen biomerkkiaineita (United States Federal Drug Administration, FDA) ovat etanoli (lain toimeenpano), vety (hiilihydraattien aineenvaihdunta), typpioksidi (astma), hiilimonoksidi (vastasyntyneen keltatauti), $^{13}\text{CO}_2$ (*Helicobacter Pylori* -infektio) ja haarautuneet hiilivedyt (sydänsiirränäisen hylkimisreaktio) [44].

Ehkä kaikkein menestyksellisin hengityskoe on hengityksen ureatesti [2]. Ureates-tiä on käytetty *Helicobacter Pylori*- bakteerin aiheuttamien infektioiden tutkimiseen. *Helicobacter Pylori* on yksi yleisimmistä ihmisten infektioiden aiheuttajista. Ureatesti perustuu *Helicobacter Pylori* -bakteerin kykyyn hajottaa ureaa ureaasientsyymin katalysoimana seuraavan reaktion mukaisesti [45]:



Ureaa syntyy elimistössämme ylimääräisestä typestä. Ureatestissä koehenkilö nielee kapselin, joka sisältää hiilen isotoopilla ^{13}C tai ^{14}C merkittyä ureaa. Jos bakteeria on vatsassa, se muuttaa urean isotooppimerkityksi hiilidioksidiksi, joka kulkeutuu verenkierron mukana keuhkoihin. Siten tätä isotooppimerkittyä hiilidioksidia voidaan mitata uloshengityksestä. Hiilen isotooppisuhde voidaan mitata massaspektrometrial-

la tai infrapunaspektroskopiolla. Hiilen isotooppi 13 on kuitenkin melko yleinen myös luonnossa, mikä rajoittaa menetelmän herkkyyttä. Menetelmän edellytyksenä on, että hiilidioksidin erittymistä seurataan tiiviisti ja määrättyissä olosuhteissa.

Toinen tärkeä ruuansulatushäiriöihin liittyvä hengitystesti on vetytesti [46]. Hengityksen vetytestit perustuvat siihen, että ihmisessä syntyvä vety on peräisin ainoastaan bakteerien hiilihydraattiaineenvaihdunnasta. Näissä testeissä tutkittavalle henkilölle annetaan suun kautta erilaisia hiilihydraatteja, minkä jälkeen uloshengityksen vetyä mitataan. Kun sokerien imeytyminen on häiriintynyt, imeytymättömät sokerit ovat ruuansulatuselimistön bakteerien saatavilla ja bakteerit muuttavat sokerit vedyksi, joka vapautuu verenkierron kautta uloshengitykseen. Vetytestiä on käytetty muun muassa suoliston laktaasientsyymin puutoksen aiheuttaman laktoosi-intoleranssin toteamiseen.

Kapnografia on myös yleinen hengitysanalyysin sovellus [47]. Kapnografilla seurataan hiilidioksidin konsentraatiota tai osapainetta, mikä voidaan tehdä usealla eri tavalla. Kapnografi piirtää hiilidioksidin konsentraation hengityssyklin aikana graafisesti, kun taas kapnometrillä konsentraatiota seurataan numeerisesti hengityksen aikana. Kapnografian avulla saadaan tietoa esimerkiksi hiilidioksidin tuotosta kudoksissa nukutuksen aikana ja siten keuhkojen tuulettumisnopeudesta. Suurin osa hiilidioksidin konsentraatiota seuraavista tekniikoista perustuu hiilidioksidin absorptioon infrapuna-alueella, mutta myös massaspektrometrejä käytetään. Hiilidioksidia voidaan mitata joko suoraan hengitysteistä intubaatioputkessa sijaitsevan sensorin avulla tai sitten hengitysnäytteestä voidaan mitata vain osa ohjaamalla näyte monitorin sisällä olevaan sensoriin. Kapnografia käytetään esimerkiksi muiden hengitystestien yhteydessä varmistamaan, että potilas hengittää oikealla tekniikalla hyper- tai hypoventiloimatta. Sillä voidaan seurata myös hengitystilavuutta ja -tiheyttä.

Keuhkosairauksien tunnistamisessa hengitysanalyysi on lähes ainutlaatuinen. Yleisin hengitysanalyytikkojen tutkima keuhkosairaus on astma. Sen tunnistamisessa käytetään monesti typpimonoksidia [48]. Astma on krooninen hengitysteiden tulehdus, jonka oireita ovat muun muassa hengityksen vinkuna, yskä ja hengen ahdistus. Ko-

honnut typpimonoksidi ei ole spesifinen astmalle, mutta sen avulla voidaan kuitenkin erotella astma muista kroonisista yskistä. Typpimonoksidia syntyy L-arginiinista kolmen erilaisen entsyymin vaikutuksesta [48]. Typpimonoksidi voi olla merkki myös monesta muusta hengitysteihin liittyvästä ongelmasta. Se on peräisin lähinnä ylä- ja alahengitysteistä, ei niinkään verenkierrosta. Joitakin kaupallisia typpimonoksidianalysaattoreita on nykyään saatavilla. Ne kaikki perustuvat samaan kemiluminesenssi-tekniikkaan, joka on herkkä ja selektiivinen, mutta laite on suuri ja kallis. Lisäksi laite vaatii vakuumpumpun, myrkyllisen otsonin käyttöä, suuria jännitteitä ja valomonistinputken.

Uloshengityksen hiilivetyjä on mitattu lukuisissa erilaisissa olosuhteissa. Hiilivetyjä voidaan pitää epäspesifisenä merkinä monityydyttymättömien rasvahappojen peroksidaatiosta, mikä on seurausta esimerkiksi elimistössä muodostuvista happiradikaaleista [49]. Hapettavasta stressistä (engl. oxidative stress) on kyse, kun elimistön vapaiden radikaalien tuotto ja antioksidanttisysteemi ovat epätasapainossa. Se on seuraus esimerkiksi elimistön ikääntymisestä tai jostakin sairaudesta. Esimerkiksi etaanin ja pentaanin kohonneita pitoisuuksia on havaittu rintasyöpäpotilailla, sydänsiirrännäisen hylkimistapauksissa ja astmaatikoilla ([50] - [52]). Muun muassa Phillips et al. määrittivät rintasyöpäpotilaiden uloshengitysilmaa sorbenttien ja kaasukromatografian avulla [53].

Kaikkialla maailmassa liikenteen lainvalvonnassa käytettävä alkometri on herättänyt keskustelua hengitysanalyttikkojen keskuudessa. Kuten edellä on kerrottu, erittäin vesiliukoiset kaasut vaihtuvat lähinnä hengitysteissä. Siten esimerkiksi vesiliukaisen etanolin kohdalla tehty oletus, että uloshengityksen loppuosan konsentraatio on sama kuin keuhkorakkuloissa oleva konsentraatio, on väärä. Uloshengityksen aikana etanolin konsentraatio laskee liuetessaan hengitysteiden kudoksiin. Siksi yhden hengityskerran aikana ei saada todellista etanolin pitoisuutta määritettyä ja hengityksen loppuosan etanolipitoisuus on aina pienempi kuin keuhkorakkuloissa oleva pitoisuus. Hlastala ja Anderson havaitsivat tutkimuksissaan myös, että yhteen hengityskertaan perustuva hengitystesti riippuu keuhkojen koosta ja aiheuttaa virheen henkilöille, joiden keuhkot ovat pienet [54]. Tutkimuksen mukaan pienikeuhkoisien naisten hengi-

tyksen alkoholipitoisuus on 5,6 % suurempi kuin miehillä. Siten alkoholitesti yliarvioi pienikeuhkoisten ihmisten veressä olevan alkoholin määrää.

Kuten edellä mainituista vakiintuneimmista hengitystesteistä käy ilmi, on hengitysanalyysin parissa tehtävä vielä paljon töitä. Testeissä nousi ongelmaksi esimerkiksi puutteet laitteissa: ne ovat vielä liian kalliita, vaikeakäyttöisiä ja suuria kenttätutkimukseen (esimerkiksi typpimonoksidi). Toisaalta hengitysilman alkoholitesti on edullinen, nopea ja helppokäyttöinen, mutta sen käyttöä ihmisten tuomitsemisessa on kritisoitu, sillä sen epäillään yliarvioivan pienikeuhkoisten ihmisten veren etanolin määrää. Fysiologian lisäksi on myös vaikeaa kartoittaa, mistä yhdisteet ovat päätyneet hengitysilmaan. Suurinta osaa ehdotetuista biomerkkiaineista havaitaan myös ympäröivässä ilmassa, ruuissa, juomissa ja osa yhdisteistä saattaa liittyä eri elimien toimintaan (esimerkiksi typpimonoksidi).

Hengitysanalyysin kehittäminen on kannattavaa elimistöön kajoamattomuutensa ja miellyttävyytensä vuoksi. Sen etuna on myös se, että hengitystä voidaan seurata nopeasti ja reaaliaikaisesti toisin kuin esimerkiksi verta analysoitaessa. Hengitysanalyysi voisi olla toimiva muun muassa tilanteissa, joissa tarvitaan välitöntä tietoa potilaan terveyden tilasta ennen verikokeiden tuloksia. Tällainen tilanne voi olla mahdollinen esimerkiksi tulipalo-onnettomuuksissa, joissa savulle altistuneet ihmiset ja eläimet vaativat välitöntä hoitoa jo onnettomuuspaikalla. Seuraavissa kappaleissa ja tutkielman kokeellisessa osuudessa ehdotetaan vetysyanidia uudeksi biomerkkiaineeksi *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerin infektoimien diabeetikoiden määrittämiseen. Tutkielmassa halutaan korostaa erityisesti ontelovaimenemisspektroskopiaa yhtenä tulevaisuuden lupaavimmista hengitysilman mittaamiseen soveltuvista tekniikoista.

5 Vetysyanidi hengitysilmassa

Vetysyanidi (HCN) on väritön kaasu tai sinisenvalkoinen neste, joka tuoksuu hieman mantelille. HCN on heikosti hapan pK_a arvon ollessa 9,22 huoneenlämpötilassa, ja se liukenee helposti veteen ja alkoholeihin [55]. Osa ihmisistä pystyy haistamaan sen 0,2 - 5 ppm pitoisuuksilla [56]. HCN on erittäin myrkyllinen yhdiste ja tappaa muutamissa sekunneissa tai minuuteissa riittävän korkeilla pitoisuuksilla. Vetysyanidimyrkytyksen oireisiin kuuluvat esimerkiksi heikkouden tunne, päänsärky, sekavuus ja oksentaminen [57]. Syanidimyrkytystä hoidetaan erilaisilla vasta-aineilla, mutta myrkytyksen toteamiseen tarvitaan verikoe.

Vetysyanidia esiintyy periaatteessa kaikkialla luonnossa. Sitä vapautuu ilmakehään esimerkiksi biomassan poltossa, tulivuorista ja luonnollisista biogeenisistä prosesseista ([58] - [61]). Syanidia esiintyy luonnostaan syanogeenisessä glykosidimuodossa, jota lukuisat kasvit sisältävät, esimerkkinä mainittakoon kassava (tapioka, maniokki), bataatti, maissit ja linssit ([62] - [64]). Sitä voidaan löytää myös manteleista. Yhdestä tupakasta ilman suodatinta saa keskimäärin 500 mikrogrammaa vetysyanidia ja suodattimen kanssa 100 mikrogrammaa [65]. Ilmassa olevasta syanidista suurin osa on peräisin muun muassa liikenteen päästöistä, kemikaalien valmistuksesta, prosessiteollisuudesta (esimerkiksi metallurgiasta) ja joidenkin materiaalien poltosta (esimerkiksi polyuretaani ja akrylonitriili) ([58], [65], [66], [67]).

Vetysyanidia on löydetty myös monien rakennusmateriaalina käytettävien synteettisten polymeerien palamiskaasuista [68]. Tämän vuoksi vetysyanidi saattaa olla tärkeä tekijä tulipalokuolemista hiilimonoksidin lisäksi, koska uhrit menettävät helposti tajuntansa altistuessaan tulipalojen suurille HCN-pitoisuuksille. Hengitysanalyysiä on ehdotettu uudeksi, nopeaksi ja turvalliseksi työkaluksi tulipaloissa vetysyanidille altistuneiden diagnosointiin, mutta se vaatii vielä lisää tutkimusta. Tästä motivoituneena esimerkiksi K. Stamy et al. tutkivat vetysyanidin poistumisnopeutta ihmiselimistöstä, kun koehenkilöitä altistettiin minuutin ajan vetysyanidiseokselle, jonka pitoisuus oli 10 ppm [69]. Kokeissa paljastui, että hengitysteistä huuhtoutuvan vetysyanidin keskimääräinen puoliintumisaika on 16 s ja ekstrapolointi suuremmille veren konsentraatioille osoitti, että HCN voisi olla potentiaalinen merkki myrkytyksestä. Siksi Stamy

ehdottaa, että hengitysilman vetysyanidia voitaisiin käyttää tulipalon uhrien mahdollisen vetysyanidimyrkytyksen toteamiseen verikokeiden sijaan.

Tian et al. ehdottavat vetysyanidimyrkytyksen saaneiden nopeaan diagnosointiin kertakäyttöistä verisyanidisensoria [70]. Sensori perustuu syanidin ja hydroksosyanokobinamidin (OH(CN)Cbi) väliseen nopeaan reaktioon. Sensorissa on kaksi sisäkkäin olevaa erikokoista petrimaljaa ja kansi, joka sopii ulomman maljan päälle. Kannessa on päinvastaisesti pujotettu huokoinen polypropyleeni membraaniputki, joka on täytetty nestemäisellä hydroksosyanokobinamidilla. Putken toisessa päässä on valodiiodi, joka emittoi 583 nm:n valoa ja toisessa päässä on optinen suodatin ja ilmaisin. Osa verinäytteestä laitetaan sisempään petrimaljaan, kansi suljetaan ja kannen kautta syötetään happoa. Haihtuva HCN diffundoituu huokoisen membraanin läpi ja muuttuvaa absorbanssia mitataan. Mittaustulos voidaan lukea esimerkiksi tietokoneelta. Sensorin väitetään soveltuvan veren syanidipitoisuuden mittaamiseen kenttäolosuhteissa alle neljässä minuutissa.

Vetysyanidi on poolinen yhdiste, minkä vuoksi se liukenee sisäänhengitettäessä vettä muistuttavien keuhkojen limakalvojen pinoille. Uloshengityksessä limakalvoille liuennut vetysyanidi voi diffundoitua takaisin hengitysilmaan. Tätä ilmiötä K. Stamyri et al. tutkivat edellä mainitussa kappaleessa. [71] K. Stamyri ja G. Johanson ovat myös mallintaneet vetysyanidia ihmisen hengitysilmassa fysiologiaan perustuvan toksikoki-neettisen mallin (engl. physiologically based toxicokinetic modeling, PBTK) avulla [71].

PBTK-mallissa kehoa kuvataan jakamalla se erilaisiin lokeroihin. Jokainen lokero kuvaa yhtä elintä, elimen osaa tai elinten ryhmää. Lokerointiin vaikuttaa muun muassa tutkittava kemikaali. Jos elimistön jostaista elintä kohden käytetään omaa lokeroa, saadaan monimutkainen, mutta elimistöä parhaiten kuvaava malli. PBTK-mallissa oletetaan usein, että kemikaali jakautuu tasaisesti ja välittömästi kuhunkin lokeroon. Lokeroinnin jälkeen mallinnukseen laaditaan differentiaaliyhtälöitä ja arvioidaan yhtälöissä käytetyt parametrit. Lopulta yhtälöt ratkaistaan ja mallin soveltuvuutta testataan [71].

K. Stamyriin ja G. Johansonin PBTK-malli vetysyanidille hengitysilmassa jakaa

kehon kuuteen lokeroon: plasmaan, punasoluihin, lihaksiin, maksaan, muihin kudoksiin ja rikkilokeroon [71]. Vetysyanidin aineenvaihdunnasta suurin osa koostuu tiosyanaatin muodostumisesta. Syy siihen, että punasolut ovat oma lokeronsa, on niiden sisältämä methemoglobiini. Methemoglobiini on hemoglobiinin hapettunut muoto, joka sitoo itseensä syanidia. Soluhengityksessä sytokromi-C-oksidaasi muuttaa hapen vedeksi. Samalla syntyy solujen energian lähteenä käytettävää adenosiniinotriifosfaattia (ATP). Veressä oleva syanidi heikentää prosessia sitoutumalla sytokromi-C-oksidaasin rautaioni-osaan, mikä voi aiheuttaa solukuoleman. Syanidimyrkyksessä siis solujen kyky sitoa veren happea heikkenee. Samalla veren plasman laktaattipitoisuus kasvaa ja solujen anaerobinen aineenvaihdunta kiihtyy [73].

Stamyr ja Johanson havaitsivat PBTK-mallinsa avulla, että syanidimyrkytyksen saaneilla syanidipitoisuus oli 1 - 2 kertalukua suurempi kuin taustatasot. [71] He havaitsivat, että syanidin kulkeutuminen elimistössä oli myös voimakkaasti riippuvainen fyysisen rasituksen määrästä. Toisaalta taas aineenvaihdunnan merkitys oli pieni. Aika, joka johtaa kuolemaan, oli mallin mukaan riippuvainen plasmaan ja punasoluihin sitoutuneen osuuden määrästä. Punasoluihin sitoutuminen selittyy luultavasti veressä olevalla methemoglobiinilla. Mallin ongelma on kuitenkin se, että käytettyjä parametreja ei ole saatavilla ihmisille ja siinä oletettiin, että vetysyanidi vaihtuu vain keuhkorakkuloissa. Todellisuudessa vetysyanidi absorboituu jo ylähengitysteiden limakalvoille sisäänhengitettäessä ja desorboituu limakalvoilta uloshengitysilmaan.

HCN-pitoisuuksia on tutkittu jonkin verran aiemmin terveiden ihmisten uloshengitysilmassa. Esimerkiksi Schmidt et al. määrittivät CRDS-menetelmällä 19:sta ihmisen suun ja nenän kautta otettejun hengitysnäytteiden vetysyanidipitoisuuksia sekä ihon erittämiä vetysyanidipitoisuuksia [22]. Tutkimukset osoittivat, että suun kautta hengitettäessä HCN-pitoisuus oli korkeampi kuin nenän kautta hengitettäessä (keskiarvo 4,65 ja 1, 57 ppb). Samassa tutkimuksessa seurattiin myös HCN-pitoisuuden päivittäistä vaihtelua, mistä huomattiin, että esimerkiksi kahvin juominen ja ruokailu kasvattavat HCN-pitoisuuksia tilapäisesti.

Edellä kuvatun tyyppisen tutkimuksen tekivät myös Španěl et al. tutkiessaan

eri-ikäisten ihmisten asetoni, ammoniakki ja HCN-pitoisuuksia hengitysilmassa SIFT-MS menetelmällä [9]. He havaitsivat, että HCN-pitoisuus ei vaihtelee merkittävästi iän myötä ja arvot vaihtelivat välillä 1 - 60 ppb. Näytteet oli otettu suun kautta ja he käyttivät pienempää hengitysnopeutta, mikä saattaa selittää korkeammat pitoisuudet kuin CRDS-menetelmällä mitatut. Motivaationa tutkimukselle oli, että kystistä fibroosia sairastavilla ihmisillä on monesti keuhkot ja hengitystiet kolonisoituneet *Pseudomonas aeruginosa* -bakteerilla (PA).

Pseudomonas aeruginosa on gram-negatiivinen bakteeri, jonka aiheuttaman infektion riskitekijöiksi mainitaan esimerkiksi hemodialyysi, syöpä, elimensiirto, sydän-sairaus, HIV-infektio ja diabetes [7]. Se aiheuttaa esimerkiksi virtsa- ja hengitystieinfektioita. PA on erityisen haitallinen, koska se on resistentti monille antibiooteille ja tunnetaan niin sanottuna sairaalabakteerina. Bakteeri on siis luonnostaan resistentti antibiooteille gram-negatiivisuudestaan johtuen, koska gram-negatiivisilla bakteereilla on antibiooteilta suojaava ulkokuori. Lisäksi PA:lla on taipumus kolonisoitua kalvoina infektoituihin kudoksiin, minkä vuoksi antibioottien on vaikea läpäistä sitä.

Pseudomonas aeruginosa on mielenkiintoinen hengitysanalyysin kannalta, sillä joidenkin kantojen on tiedetty jo pitkään erittävän vetysyanidia [72], jota voitaisiin ehkä tulevaisuudessa käyttää biomerkkiaineena PA-infektion määrittämisessä. Carroll et al. havaitsivat SIFT-MS -menetelmällä, että HCN-pitoisuudet ovat merkittävästi suurempia PA-positiivisten bakteeriviljelmien yllä kuin muissa bakteerinäytteissä [72]. Vuonna 2009 Enderby et al. tutkivat lasten, joilla on sekä kystinen fibroosi että PA-infektio, uloshengitysilmaa [74]. Tutkimukset osoittivat, että HCN-pitoisuudet olivat korkeampia niiden lasten uloshengitysilmassa, joilla oli kystinen fibroosi kuin niiden, joilla oli vain astma. Lechner et al. havaitsivat PTR-MS -menetelmällä myös, että *Helicobacter Pylori* -bakteerin infektoimilla potilailla HCN- ja HNO₃-pitoisuudet olivat kontrolliryhmään nähden suurempia [75]. Tämän bakteerin ei kuitenkaan tiedetä tuottavan vetysyanidia, minkä vuoksi he arvelivat, että kohonnut pitoisuus voisi syntyä kroonisessa tulehduksessa neutrofilien tuottamana [76].

6 Diabetes

Diabetes mellitus eli diabetes on krooninen aineenvaihdunnan häiriö, jossa haima ei pysty tuottamaan insuliinia tai keho ei pysty käyttämään tuotettua insuliinia tehokkaasti [5]. Insuliini on hormoni, joka auttaa veren glukoosia siirtymään soluihin, jolloin verensokeri laskee. Glukoosi puolestaan toimii soluissa energian ja kasvun lähteenä. Kohonnut verensokeri (engl. hyperglycaemia) on merkki diabeteksestä ja hoitamattomana se voi pahimmassa tapauksessa johtaa kuolemaan. Maailman terveysjärjestö WHO:n [5] mukaan 347 miljoonalla maailman ihmisellä on diabetes. Sen mukaan vuonna 2004 3,4 miljoonaa ihmistä kuoli korkean verensokerin aiheuttamiin seurauksiin. Lisäksi WHO ennustaa diabeteskuolemien kaksinkertaistuvan vuosien 2005 ja 2030 välisenä aikana. Suomen Diabetesliiton [6] mukaan Suomessa on puolestaan noin 40 000 tyypin 1 diabeetikkoa ja 250 000 tyypin 2 diabeetikkoa. Diagnosoimattomia tyypin 2 diabeetikoita Diabetesliitto arvioi olevan noin 200 000.

Diabetesta on kolmea eri tyyppiä: tyypin 1 diabetes, tyypin 2 diabetes ja raskautteen liittyvä diabetes [5]. Tyypin 1 diabeteksestä käytetään myös nimitystä lapsuustyypin diabetes, jossa elimistö tuhoaa omat insuliinia tuottavat betasolunsa. Tyypin 1 diabeetikko joutuu siis päivittäin pistämään insuliinia itseensä. Tyypin 2 diabeteksessa puolestaan insuliinin tuotto on vähentynyt elimistössä tai insuliinin toiminta on heikentynyt (niin sanottu insuliiniresistenssi). Tällainen diabetes johtuu suurimmalla osalla liikalihavuudesta ja se voi parantua lähes kokonaan, jos liikunnan määrää lisätään ja ruokavaliota muutetaan vähähiilihydraattisemmaksi. Raskautteen liittyvä diabetes muistuttaa tyypin 2 diabetesta ja diagnosoidaan useimmiten raskauden aikana.

Hoitamattomana diabetes voi johtaa lukuisiin muihin vakaviin sairauksiin. Näihin lukeutuvat esimerkiksi munuaissairaudet ja -vauriot, sydänsairaudet, ääreisverenkierron sairaudet, hermosairaudet ja silmäongelmat [6]. Siksi veren glukoositason seuraaminen on tehtävä lukuisia kertoja päivässä omaseurannan periaatteella, esimerkiksi aina ennen ruokailua ja sen jälkeen. Seuraaminen tehdään glukosimittarilla, johon vaaditaan joka kerta verinäyte esimerkiksi sormen päästä. Osa diabeetikoista kokee pistämisen epämiellyttävänä ja pahimmassa tapauksessa kammoaa neuloja. Neulakammo saattaa parantua ajan myötä, mutta joillakin se voi johtaa hoitamattoman diabeteksen vuoksi

jopa kuolemaan. Tämän vuoksi neulattomalle veren glukoositason määrittämenetelmälle on kysyntää. Lisäksi vielä diagnosoimattomien diabeetikoiden tunnistamiseen kaivataan yksinkertaista menetelmää. Myös diabeteksen aiheuttamien komplikaatioiden määrittämiseen tarvitaan lisää tutkimusta. Yksi näiden ongelmien ratkaisusta saattaa tulevaisuudessa löytyä hengitysanalyysistä, joka on verikokeisiin verrattuna kivuton, helppo ja elimistöön kajoamaton menetelmä.

6.1 Diabetes ja hengitysanalyysi

Edellä mainituista syistä hengitysanalyysistä on haettu vaihtoehtoisia menetelmiä veren glukoositasojen määrittämiseen. Diabeteksen tutkimiseen liittyvää hengitysanalyysiä onkin viime aikoina käytetty lähinnä uusien veren glukoosipitoisuuden kanssa korreloivien biomerkkiaineiden etsimiseen. Diabeteksen on ehdotettu vaikuttavan muun muassa uloshengityksen hiilimonoksidi-, hiilidioksidi-, alkaani-, etanoli- ja asetonipitoisuuksiin ([4], [77] - [80]). Hengitysanalyysi ei ole kuitenkaan vielä korvannut jo kymmeniä vuosia käytettyä veren entsyymattista glukoosipitoisuuden määrittämistä. Testi on tarkka, nopea ja glukoosimittarit ovat nykyään lähes taskukokoisia. Siksi korvaavaa menetelmää on vaikea löytää.

Tutkielman kaltaisia tutkimuksia, joissa tarkastellaan johonkin diabeteksen komplikaatioon liittyviä uloshengitykseen erittyviä biomerkkiaineita on vähän. Ehkä eniten on tutkittu diabeteksen komplikaatioksi mainittavaa hapettavaa stressiä ja siihen liittyviä biomerkkiaineita. Hapettavan stressin ajatellaan olevan yksi diabeteksen puhkeamiseen laukaisevista tekijöistä ja yksi diabetekseen liittyvistä komplikaatioiden aiheuttajista. Hapettavan stressin aiheuttajia ovat mitokondrioista vapautuvat reaktiiviset happiyhdisteet (engl. reactive oxygen species, ROS), jotka hyökkäävät solujen lipideihin, proteiineihin ja nukleiinihappoihin. Se, miten diabetes puhkeaa näiden yhdisteiden vaikutuksesta, on monimutkainen prosessi. Hapettavan stressin syyksi diabeetikoilla ajatellaan ROS-yhdisteiden pitoisuuden kasvaminen tai antioksidanttipuolustuksen heikentyminen. Hapettavan stressin ja diabeteksen biomerkkiaineiksi on ehdotettu muun muassa vetyperoksidia ja hiilimonoksidia. ([81], [77])

Aineenvaihdunnallisiin häiriöihin kuuluvat kaikki prosessit, jotka häiritsevät elimistön normaalia ruuan käsittelyä kehon terveenä pitämiseen. Diabetes luokitellaan aineenvaihdunnalliseksi häiriöksi. Diabetekseen liittyvä insuliinituotannon heikkeneminen aiheuttaa veren glukoositason nousemisen ja rasvahappojen pilkkoutumisen. Koska glukoosia ei voida käyttää elimistön normaaliin energian saantiin, maksa muodostaa erilaisia ketoneita ja käyttää niitä toisarvoisena energian lähteenä. Tätä elimistön tilaa kutsutaan ketoosiksi. Ketoosissa siis hiilihydraattien aineenvaihdunta muuttuu rasvahappojen aineenvaihdunnaksi. Tila voi syntyä hoitamattomassa diabeteksessä, pitkäkestoisessa rasituksessa ja paastoamisessa. Ketoneiksi diabeteksen yhteydessä luokitellaan asetoasetaatit, 3- β -hydroksibutyraatit ja asetoni [82]. Asetonia syntyy asetoasetaatin dekarboksylaatioissa ja isopropanolin dehydrogenaatioissa [83].

Diabeettisen ketoosin vuoksi hoitamattoman diabeetikon uloshengitysilmaasta voidaan usein tunnistaa asetonin hedelmäinen haju. Siksi monissa tutkimuksissa on ehdotettu myös uloshengitysilman asetonia diabeetikon tunnistamiseen [4]. Asetonin pitoisuutta uloshengitysilmassa ja sen korrelaatioita veren glukoosipitoisuuden kanssa onkin tutkittu laajasti, mutta tulokset ovat ristiriitaisia. Esimerkiksi Greiter et al. havaitsivat, että asetonin määrä on suurempi diabeetikoiden uloshengitysilmassa kuin terveillä [84]. He kuitenkin kritisoivat sen käyttöä biomerkkiaineena, sillä sen kohonnut pitoisuus hengitysilmassa voi liittyä muun muassa valkosipulin tai hedelmien syömiseen tai intensiiviseen kuntoiluun. Toisaalta Galassetti et al. havaitsivat asetonin ja etanolin korreloivan veren glukoosipitoisuuden kanssa [80].

Diabeetikoilla iho- ja pehmytkudosinfektiot ovat useimmiten paljon vakavampia kuin muilla ihmisillä [6]. Monet diabetekseen liittyvät komplikaatiot voivat johtaa näihin infektioihin. Kuten edellä mainittiin, on diabetes yksi PA-infektioon ajavista riskitekijöistä. Koska Enderby et al. havaitsivat PA-bakteerin infektoimien kystistä fibriosia sairastavien lasten uloshengitysilmassa kohonneita vetysyanidipitoisuuksia [74], voisi olla mahdollista havaita myös PA-bakteerin infektoimien diabeetikoiden uloshengitysilmassa kohonneita HCN-pitoisuuksia. Jos näin olisi, voitaisiin vetysyanidia käyttää tulevaisuudessa PA-infektioiden toteamisen apuna verikokeiden rinnalla. Siksi tämän tutkielman kokeellisessa osiossa päädyttiin tutkimaan diabeetikoiden ulos-

hengitysilman vetysyanidipitoisuuksia.

7 Kokeelliset menetelmät

Tämän tutkielman kokeellinen osuus tehtiin Helsingin yliopiston fysikaalisen kemian laboratoriossa vuosina 2011 ja 2012. Kokeellinen osuus tehtiin osana Helsingin yliopiston FinnDiane- tutkimusta (Finnish Diabetic Nephropathy Study) ja tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää vetysyanidin soveltuvuutta uloshengitysilman biomerkkiaineeksi munuaisvauriosta kärsiville diabeetikoille. Hengitysnäytteiden mittaamiseen käytettiin itse rakennettua ontelovaimenemisspektrometria.

7.1 Koehenkilöt

7.1.1 Kontrollit

Kontrollinäytteet henkilöiltä 1 - 20 kerättiin Helsingin yliopiston fysikaalisen kemian laboratorion henkilökunnalta ja opiskelijoilta. Kontrollihenkilöt 21 - 25 olivat Meilahden FinnDiane-projektin tutkimushenkilökuntaa. Kaikki osallistujat antoivat tutkimukseen kirjallisen suostumuksensa, ja heillä oli halutessaan mahdollisuus keskeyttää tutkimus. Kontrollinäytteet kerättiin, jotta voitiin selvittää vetysyanidin pitoisuus nenän kautta pussiin hengitetystä ilmasta terveillä ihmisillä.

Henkilöille annettiin ohjeeksi olla syömättä ja tupakoimatta aamiaisen jälkeen. Näytteet kerättiin useimmiten aamiaisen ja lounaan välissä. Tutkittavia oli siis yhteensä 25, ja tarkemmat tiedot heistä on koottu taulukkoon 3. Henkilöiden keski-ikä oli 33,3 vuotta ja heistä 10 oli naisia ja 15 miehiä. Ikä vaihteli välillä 21 - 62 vuotta. Suurin osa heistä oli tupakoimattomia. Henkilö 10 kertoi tupakoineensa mittauspäivän aamuna noin kaksi tuntia ennen mittausta puolikkaan tupakan. Henkilöt 15 ja 17 kertoivat tupakoineensa mittausta edeltävänä iltana. Kuten edellä kerrottiin, jokaisella tupakointikerralla vetysyanidia joutuu elimistöön, minkä vuoksi tieto tupakoinnista oli tutkimuksen kannalta tärkeää.

Suostumuslomakkeessa kysyttiin myös olivatko henkilöt syöneet kassavaa, maniokkia, passionhedelmää, bambunversoja, manteleita/mantelimassaa tai puuvillansie-

meniä/puuvillansiemenöljyä, sillä näiden tiedetään sisältävän vetysyanidia. Henkilöt 25 ja 5 ilmoittivat syöneensä passionhedelmää lähiaikoina, henkilö 6 bambunversoja kolme päivää sitten, henkilö 7 passionhedelmää kolme päivää sitten ja manteleita edellisenä päivänä, kuten myös henkilö 9. Lisäksi henkilö 21 ilmoitti syöneensä manteleita edellisenä päivänä.

Henkilö	Ikä / vuosi	Sukupuoli	Tupakointistatus	Aika edellisestä ruokailusta / h
1	35	M	E	2,75
2	21	N	E	4
3	49	M	E	2,5
4	35	M	E	3,75
5	21	M	E	2,5
6	23	N	E	3
7	22	N	E	4
8	21	M	E	13,25
9	55	M	E	1,5
10	23	M	K	13
11	34	M	E	1
12	25	N	E	17
13	40	M	E	3
14	24	M	E	12
15	62	M	K	2,5
16	25	N	E	9
17	35	M	K	2,75
18	24	M	E	16
19	44	N	E	3
20	43	M	E	2,5
21	40	N	E	2,5
22	26	N	E	2,25
23	23	M	E	2,5
24	26	N	E	2,25
25	57	N	E	2,5
Keskiarvo	33,3	-	-	5,2

Taulukko 3: Yhteenveto kontrollihenkilöistä. Selitykset merkinnöille: M=mies, N=nainen, E=ei ja K=kyllä.

7.1.2 Diabeetikot

Diabeetikoiden hengitysnäytteiden otto oli osa suurta Helsingin yliopistossa vuonna 1998 alkanutta FinnDiane -tutkimusta (Finnish Diabetic Nephropathy Study), jonka

tavoitteena on löytää diabetekseen liittyvälle munuaisvauriolle eli diabeettiselle nefropatialle ja muille diabeteskomplikaatioille altistavia geneettisiä tekijöitä [85]. Näytteet ja suostumuslomakkeet diabeetikoilta keräsivät FinnDiane-projektin sairaanhoitajat, joita opastettiin näytteiden otossa ennen tutkimusyhteistyön aloittamista. Näytteet haettiin mitattavaksi Meilahdesta potilaalle tehdyn FinnDiane-tutkimusprotokollan päätyttyä. Taulukossa 4 on tiedot diabeetikoiden viimeaikaisesta ruokailusta, tupakoinnista, munuaisvaurion asteesta, iästä ja sukupuolesta. Tutkituista 10 oli naisia ja 11 miehiä. Heidän keski-ikänsä oli 56 vuotta ja ikä vaihteli välillä 39 - 73. Henkilöt 5 ja 7 kertoivat tupakoivansa. Kumpikin arvioi polttavansa 10 tupakkaa päivässä. Henkilön 5 edellisestä tupakoinnista oli kulunut noin 2,5 tuntia ennen näytteenottoa ja henkilön 7 noin 13 tuntia.

Henkilö	Ikä / vuosi	Sukupuoli	Tupakointistatus	Aika edellisestä ruokailusta / h	Munuaisluokitus
1	44	N	E	3,5	5
2	46	M	E	?	1
3	66	N	E	4,75	1
4	63	M	E	4	3
5	48	M	K	?	3
6	73	M	E	1,25	2
7	39	N	K	3,25	1
8	49	M	E	4,25	1
9	55	M	E	2,25	1
10	66	M	E	4,75	3
11	51	M	E	3	3
12	53	M	E	3,25	1
13	46	N	E	3,75	1
14	52	N	E	16	2
15	43	M	E	3,25	3
16	69	N	E	4,5	?
17	65	N	E	4,75	1
18	58	N	E	2,5	1
19	59	N	E	?	1
20	66	M	E	2,5	1
21	55	N	E	4	1
Keskiarvo	56	-	-	?	-

Taulukko 4: Yhteenveto diabeetikoista. Selitykset merkinnöille: M=mies, N=nainen, E=ei, K=kyllä, 1= normaali albumiinieristys, 2=mikroalbuminuria, 3=makroalbuminuria, 4=dialyysi, 5=munuaissiirto ja ?=tietoa ei saatavilla

Diabeetikoista henkilö 8 oli syönyt mittausta edeltävänä päivänä papuja ja viisi päivää aikaisemmin manteleita. Lisäksi henkilöt 11, 17 ja 18 kertoivat syöneensä manteleita 0 - 4 päivää ennen mittausta. Taulukossa 4 on myös luokiteltu se, kuinka pitkälle diabeetikoiden munuaisvaurio oli edennyt. Albumiini on valkuainen, jonka kasvanut erittyminen virtsaan kertoo munuaisen häiriintyneestä toiminnasta. Diabeetikoilla jo pienikin albumiinin lisäys virtsassa kertoo varhaisesta munuaisvauriosta. Taulukossa on käytetty luokitusta 1=normaali albumiinieristys, 2=mikroalbuminuria, 3=makroalbuminuria, 4=dialyysi ja 5=munuaisensiirto. Mikroalbuminuria viittaa lievästi kohonneeseen ja makroalbuminuria runsaaseen albumiinin eritykseen.

FinnDiane-tutkimuksen protokollaan kuului myös HbA_{1c} , sKOL, sTG, sHDL, sKREA ja hsCRP tasojen analysointi verestä. Sen suorittivat FinnDiane-projektin sairaanhoitajat. HbA_{1c} :n avulla mitataan veren punasolujen hemoglobiinin sokeroitunut osuus. Tästä testistä käytetään myös nimitystä veren ”pitkäsokeri”. sKOL viittaa veren kokonaiskolesteroliin, sTG mittaa veren triglyseridejä, sHDL (engl. high-density lipoprotein) on niin sanottu hyvä kolesteroli, sKREA mittaa munuaisten toimintaa veren kreatiniinipitoisuuden avulla ja hsCRP:n avulla voidaan tunnistaa tulehdustiloja. S-etuliite tarkoittaa, että näytteet on mitattu veren seerumista.

7.2 Näytteenotto

Jokainen koehenkilö, diabeetikot mukaan lukien, antoi yhden hengitysnäytteen lämmitettömään alumiinipäällysteiseen näytepussiin, jonka tilavuus on 1300 cm^3 . Hengitysnäyte otettiin nenän kautta käyttäen nenämaskia ja siihen välikappaleen avulla liitettyä kertakäyttöistä ja yhdensuuntaista suukappaletta. Henkilöille annettiin ohjeeksi hengittää yhden kerran normaalisti suun kautta sisään ja sen jälkeen täyttää pussi yhdellä hengityskerralla. Näytteenoton ongelmana on, että siinä kerätään sekä hengitysteistä että keuhkorakkuloista tuleva ilma. Tämä laimentaa näytettä ja alentaa tutkitavan yhdisteen konsentraatiota. Esimerkiksi aiemmista tutkimuksista voidaan selvästi havaita, että hiilidioksidipitoisuus on näytepussien kautta mitattaessa pienempi kuin on-line-mittauksissa, mikä kertoo keuhkorakkuloista tulevan ilman laimenemisestä [22]. Näytepussien annettiin kumpienkin koehenkilöiden tapauksessa olla huoneenlämmössä noin kaksi tuntia ennen mittausta, koska diabeetikoiden näytteiden haku vei monesti

melkein kaksi tuntia aikaa.

Vetysyanidin ollessa adsorptiivinen molekyyli, menetetään osa hengitysnäyttees-tä näytepussiin. Vetysyanidin adsorption vuoksi näytteenoton ja mittauksen välinen aika oli oltava suunnilleen sama kaikkien näytteiden kohdalla. Schmidt et al. ovat määrittäneet, että noin 15 % alkuperäisestä määrästä menetetään heti näytteenoton alussa, minkä jälkeen vetysyanidin adsorptio pussin seinämille hidastuu [22]. Osa vety-syanidista menetetään, koska hengitysilman veden kondensoituessa pussin seinämälle, myös vesiliukoinen HCN kondensoituu veden mukana. Veden kondensaatio johtuu hen-gitysilman ja pussin seinämän välisestä lämpötilaerosta. Lisäksi osa vetysyanidista saat-taa diffundoitua pussin läpi.

Gilchrist et al. tutkivat erilaisten näytepussien, lämmittämisen ja säilytysajan vaikutusta vetysyanidin näytehävikkiin [86]. He mittasivat PA-bakteerin infektoimien kystistä fibroosia sairastavien lasten hengitysilmaa. Jokainen potilas hengitti suoraan SIFT-MS-laitteeseen, kahteen 25 μm :n paksuiseen Nalophan pussiin, kahteen 70 μm :n Nalophan pussiin ja kahteen Tedlar pussiin. Nalophan pussi on valmistettu etyleeni-tereftalaatin polymeeristä ja Tedlar polyvinyylifluoridista. Ne ovat kaupallisia merkkejä, joita käytetään usein kaasunäytteiden keräyksessä. Pusseja säilytettiin 20 ja 37 °C lämpötiloissa, ja HCN-konsentraatio mitattiin 1, 6, 24 ja 48 tunnin jälkeen näytteenotosta. He havaitsivat, että pussien lämmittäminen ruumiinlämpöön vähensi näytehävikkiä ja paransi off-line ja on-line mittauksien välistä korrelaatiota. Lisäksi Tedlar ja 70 μm :n Nalophan pussien havaittiin olevan parhaita, sillä niissä säilytetyt näytteet korreloivat hyvin vielä 24 tunnin jälkeen on-line näytteen kanssa.

Alustavissa mittauksissa kokeiltiin voidaanko edellä mainittua näytehävikkiä pie-mentää näytepusseja lämmittämällä tai jäähdyttämällä. Kummastakaan ei koettu kui-tenkaan olevan merkittävää hyötyä, minkä vuoksi niistä luovuttiin. Näytteet ohjattiin CRDS-laitteistoon virtauttamalla näytettä pussista 500 cm^3/min nopeudella minuutin ajan massavirtaussäätimen avulla. Sen jälkeen näytekyveti suljettiin ja näytteet mitat-tiin. Heti näytepussin jälkeen käytettiin Nafion-putkea veden poistamiseen, jotta veden voimakas absorptioviiva ei häiritsisi spektrissä. Nafion-putki koostuu sulfonihapporyh-

miä sisältävästä polymeeristä, joka läpäisee voimakkaasti vettä, mutta on muuten yleisesti kemiallisesti inertti, eikä se alustavien testien mukaan vaikuta HCN-pitoisuuksiin.

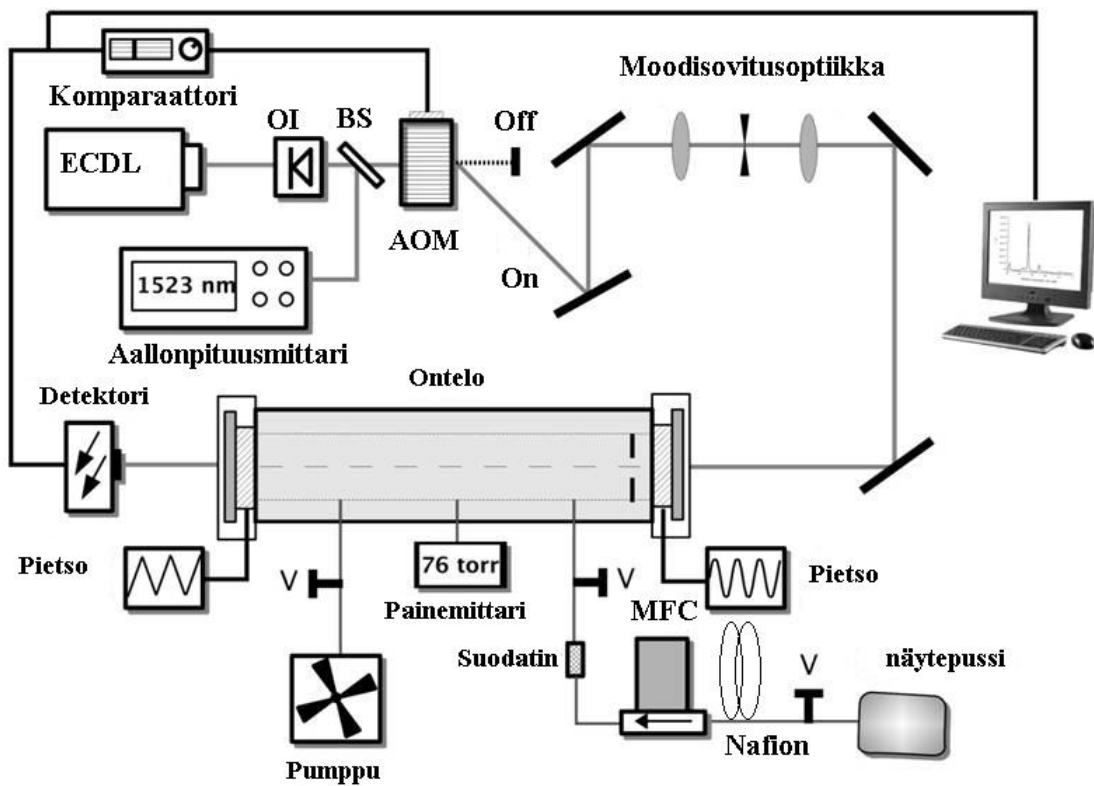
Ympäröivässä ilmassa olevan vetysyanidin osuuden varmistamiseksi mitattiin silloin tällöin potilaiden tutkimushuoneesta käsipumpun avulla pussiin otettu huoneilmanäyte. Lisäksi mitattiin aina ennen näytettä laboratorion ilmasta yksi näyte. Pitoisuudet olivat lähes määritysrajalla, minkä vuoksi niitä ei voitu varmuudella aina edes mitata ja siten ne olivat selvästi hengitysnäytteitä alhaisempia. Lisäksi varmistettiin aiemmin tehtyjen mittauksien vuoksi, ettei ontelon seinämille jäänyt HCN aiheuta kontaminaatioita näytteisiin. Tutkimuksissa havaittiin, että suljetusta ontelosta peräkkäin mitattujen neljän spektrin HCN-pitoisuuksien ero oli mitätön, mutta mitattaessa 20 spektriä havaittiin, että vetysyanidin pitoisuus kasvoi huomattavasti ensimmäisiin nähden, mikä selittyy sillä, että ontelosta vapautuu hiljalleen vetysyanidia. Näissä mittauksissa se ei kuitenkaan haitannut merkittävästi, sillä hengitysnäytteistä mitattiin ja keskiarvoistettiin neljä spektriä.

7.3 Ontelovaimenemisspektrometri

Ontelovaimenemisspektroskopiasta kerrottiin tarkemmin edellä. Näytteet mitattiin itserakennetulla ontelovaimenemisspektrometrillä, jonka yksityiskohdista kerrotaan esimerkiksi viitteessä [87]. Erona viitteessä kerrottuun spektrometriin on, että näytepussin jälkeen käytettiin edellä mainittua Nafion-putkea. Kaaviokuva laitteistosta on kuvassa 7. Lähi-infrapuna-alueen valonlähteenä käytettiin ulkoisen ontelon diodilaseria (engl. external cavity diodelaser, ECDL), jonka toiminta-alue on $6350 - 6575 \text{ cm}^{-1}$ ja teho noin 25 mW. Lasersäde johdettiin ensin optisen eristimen läpi (engl. optical isolator, OI), jottei lasersäde heijastu takaisin diodilaserille. Osa lasersäteestä johdettiin aallonpituusmittarille, ja suurin osa akusto-optiseen modulaattoriin (engl. acousto-optic modulator, AOM). Akusto-optista modulaattoria käytetään optisena kytkimenä sulkemaan säteen kulku, kun ontelossa on riittävästi valoa.

Tämän jälkeen säde ohjattiin moodisovitusoptiikkaan, jonka avulla valittiin ontelon TEM₀₀-moodit. Laserin aallonpituuden hienosäätö tehdään peiliin kytketyn pientosähköisen elementin avulla. InGaAs -valodetektorilla mitattiin ontelon läpäisyyttä

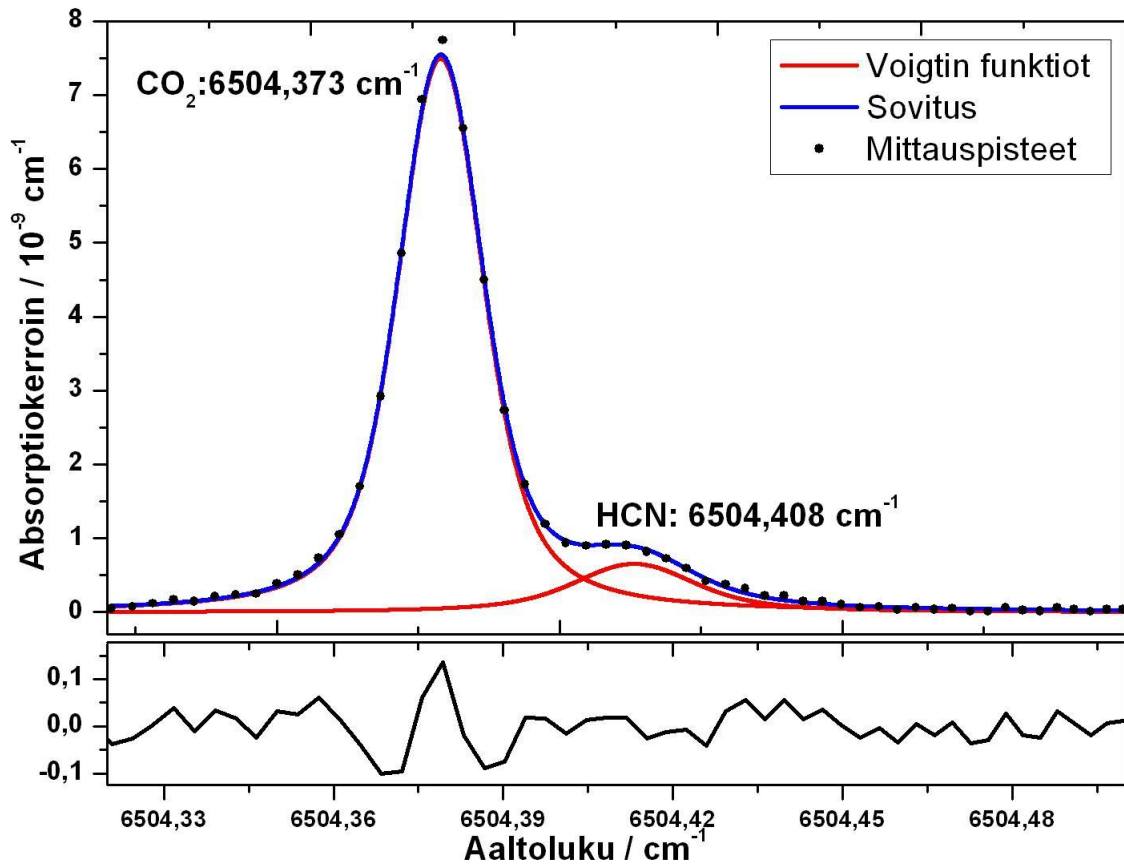
valo. Signaali ohjattiin tietokoneelle, jossa LabVIEW-ohjelma sovitti eksponenttifunktiota mittaussaineistoon ja ohjasi muutenkin mittauksia. Ontelo, jossa näyte mitattiin, on valmistettu ruostumattomasta teräksestä, jonka sisäpinnat ovat päällystetty kvartsililla kemiallisen inerttiyden takaamiseksi. Mittauksissa käytettiin kahta erilaista onteloa, joista toisen sisätilavuus oli 40 cm^3 ja toisen 500 cm^3 , koska laitteistolla tehtiin myös muita tähän tutkimukseen kuulumattomia mittauksia. Ontelon päissä olevien peilien etäisyys toisistaan oli 517 mm . Tämä peilien välinen etäisyys antaa yhtälön (17) mukaisesti vapaaksi spektrialueeksi 290 MHz .



Kuva 7: Kaaviokuva koelaitteistosta. OI on optinen eristäjä, BS säteenjakaja, AOM akusto-optinen modulaattori, V viittaa hanaan ja MFC massavirtaussäätimeen.

Ontelon lämpötila säädettiin noin 37 asteeseen lämpötilasäätimellä ja lämmitys-nauhoilla. Paine hengitysnäytteitä mitattaessa oli noin 50 Torr ja huoneilmaa mitattaessa 76 Torr . Pumppuna käytettiin kuivakierukkapumppua. Näytepussin jälkeen oli kytketty Nafion-putki. Tyhjän ontelon aikavakio oli noin $166 \mu\text{s}$. Spekitrit mitattiin aaltolukualueella $6504,5 - 6504,3 \text{ cm}^{-1}$, jossa on hiilidioksiipiikki kohdassa $6504,38 \text{ cm}^{-1}$ ja HCN piikki kohdassa $6504,41 \text{ cm}^{-1}$. Lopulliseen spektriin keskiarvoistettiin neljä

spektriä, joista jokaiseen mitattiin 60 pistettä ja jokaista pistettä kohti 50 vaimenemista. Yhden näytteen mittaus kesti noin 3,5 minuuttia. Tyypillinen spektri sovituksineen on kuvassa 8.



Kuva 8: Esimerkkispektri sovituksineen. Spektri on mitattu diabeetikon numero 8 antamasta näytteestä. Taustakorjattuun spektriin on sovitettu kaksi Voigtin funktiota (yksi vetysyanidille ja yksi hiilidioksidille), jotka näkyvät kuvassa punaisella. Lisäksi sininen funktio vastaa näiden summafunktiota. Alempi kuvaaja on mitatun spektrin ja sovitetun summafunktion välinen erotus, josta näkee selvän w-kirjaimen muodon hiilidioksidipiikin kohdalla, mikä johtuu spektrin sovitukseen käytettävän Voigtin funktion ongelmista. Spektrin vetysyanidin pitoisuus on 2,92 ppb ja hiilidioksidin pitoisuus 3,40 %.

7.4 Spektrometrin herkkyys

Absorptiokerroin voidaan laskea ontelon ominaisuuksista kaavalla

$$\alpha = \frac{1 - R}{L} \frac{\Delta\tau}{\tau}, \quad (18)$$

missä R on peilien heijastavuus, L ontelon pituus ja τ aikavakio näytteen ollessa ontelossa. Jos τ_0 on tyhjän ontelon aikavakio, voidaan kirjoittaa $\Delta\tau = \tau_0 - \tau$. Järjestämällä termejä ja käyttämällä yhtälöä (13) saadaan:

$$\alpha = \frac{1 - R}{L} \tau_0 \left[\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right] = \frac{1 - R}{L} \frac{L}{c(1 - R)} \left[\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right] \quad (19)$$

$$= \frac{1}{c} \left[\frac{1}{\tau} - \frac{1}{\tau_0} \right] \quad (20)$$

Siten pienin havaittavissa oleva absorptio on se, jonka aiheuttama aikavakion muutos $\Delta\tau$ on pienin mitattavissa oleva. Pienin mitattavissa oleva absorptio yhdellä vaimenemisella (engl. minimum detectable absorption loss in a single shot, $\text{MDAL}_{\text{shot}}$) voidaan siis ilmaista yhtälöllä:

$$\alpha_{\min} = \frac{1}{c} \left(\frac{1}{\tau_0 - \sigma_0} - \frac{1}{\tau_0} \right). \quad (21)$$

Keskipoikkeama σ_0 vaimenemisaikojen jakaumasta on jokaiselle laitteelle ominainen ja riippuu monista eri tekijöistä, kuten laserin tyypistä ja viivanleveydestä, kohinasta detektorilla ja näytteen virtauksessa tapahtuvista vaihteluista. Eli kaikki kohinaa lisäävät tekijät kasvattavat keskipoikkeamaa [94]. Sovittamalla taustakorjattuun absorptiokerroin spektriin Voigtin funktiot, saadaan residuaali, joka kertoo laitteiston signaali-kohina-suhteen. Residuaalin yhden keskipoikkeaman arvo laskettuna kuvassa 8 olevalle esimerkkispektrille on $\sigma = 2,45 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^{-1}$. Spektrin HCN-konsentraatio on 2,92 ppb ja vastaava absorptiokerroin $9,49 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^{-1}$. Lasketun signaali-kohina-suhteen avulla saadaan määrittärajaksi noin 300 ppt:tä.

7.5 Mittaustulosten analysointi

Spektriviivat eivät koskaan ole äärettömän kapeita, vaan virittyneellä tilalla on äärellinen elinaika, joka aiheuttaa spektriviivan levenemisen. Tätä niin sanottua luonnollista levenemää kuvataan Lorentzin funktiolla [88]. Kun viivan keskikohdan $\tilde{\nu}_0$ absorbanssi on A_0 , on absorbanssi aaltoluvulla $\tilde{\nu}$:

$$A(\tilde{\nu}) = A_0 \frac{\gamma_c^2}{\gamma_c^2 + 4(\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0)^2}, \quad (22)$$

missä $\gamma_c = (2\pi\tau)^{-1}$ on spektriviivan puolikorkeuden leveys. Luonnollisen levenemän merkitys on kuitenkin melko pieni verrattuna Doppler- ja painelevenemiin. Doppler-levenemä on ilmiö, jossa absorption tai emission taajuus riippuu atomin tai molekyylin nopeudesta suhteessa lasersäteeseen. Doppler-ilmiö on epähomogeeninen eli kaikki atomit tai molekyylit näytteessä eivät käyttäydy samoin. Kun viivan keskikohdan $\tilde{\nu}_0$ absorbanssi on A_0 , on absorbanssi aaltoluvulla $\tilde{\nu}$:

$$A(\tilde{\nu}) = A_0 \exp\left(\frac{-4 \ln 2 (\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0)^2}{\gamma_D^2}\right), \quad (23)$$

missä $A_0 = \frac{1}{\gamma_D} \sqrt{\frac{4 \ln 2}{\pi}}$ ja $\gamma_D = 2 \left(\frac{2kT \ln 2}{m}\right)^{1/2} \frac{\nu}{c}$, missä k on Boltzmannin vakio, T lämpötila Kelvineissä, ν siirtymän taajuus, c valon nopeus ja m massa. Suure γ_D kuvaa viivan puolikorkeuden leveyttä. Kaasufaasissa tapahtuvat törmäykset molekyylien ja atomien välillä lyhentävät virittyneen tilan elinikää ja leventävät myös spektriviivoja. Tämä niin sanottu painelevenemä on luonnollisen levenemän kaltainen ja tuottaa Lorentzin-funktion muotoisen viivanleveyden.

Voigtin profiilia käytetään spektroskopiassa silloin, kun yhdistetään Doppler- ja painelevenemät keskenään [88]. Sitä voidaan käyttää tapauksissa, joissa Doppler-levenemän puoliarvoleveys on verrattavissa Lorentzin funktion puoliarvoleveyteen. Normitettu Voigtin funktio on yksinkertaisesti normitettujen Lorentzin ja Dopplerin profiilien konvoluutio. Voigtin funktiolle ei ole analyttistä muotoa, mutta arvio sen puolikorkeuden leveydelle on:

$$\gamma_v = \frac{\gamma_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\gamma_c}{2}\right)^2 + (\gamma_D)^2}, \quad (24)$$

missä γ_c ja γ_D ovat vastaavat Lorentzin ja Doppler levenemien viivan puolikorkeuden leveys. Voigtin profiilin ongelmana on kuitenkin, ettei se ota huomioon molekyylien nopeuksien ja törmäyksellisten prosessien välisiä korrelaatioita. Ongelma ilmenee monesti spektriviivojen sovituksessa mitatun spektrin ja siihen sovitetun funktion erotuksessa näkyvänä w-kirjaimen muotona (katso kuva 8). Kirjallisuudesta löytyy lukuisia erilaisia malleja kuvaaman todellisia viivan leveyksiä, esimerkkinä mainittakoon niin sanottu Galatryn profiili [89].

CRDS-laitteistolla mitatut spektrit analysoitiin sovittamalla vetysyanidin ja hiilidioksidin absorptiopiikkeihin Voigtin funktiot Fityk-ohjelmalla [90]. Voigtin funktioiden lisäksi spektreihin sovitettiin sinifunktio korjaamaan ontelosta johtuvaa niin sanottua etalonilmiötä. Voigtin funktioita sovitettaessa käytettiin vetysyanidin ja hiilidioksidin viivan levenemälle kirjallisuudesta laskettuja arvoja. Spektriviivaa voidaan kuvata piikin paikan, korkeuden, leveyden ja pinta-alan avulla. Yhtälön (23) mukainen Doppler-levenemää vastaavan spektriviivan puolikorkeuden leveys vetysyanidille on $0,0156 \text{ cm}^{-1}$ ja hiilidioksidille $0,0122 \text{ cm}^{-1}$. Lorentzin funktion muotoisen spektriviivan puolikorkeuden leveys vetysyanidille on $0,0159 \text{ cm}^{-1}$ ja hiilidioksidille $0,00935 \text{ cm}^{-1}$. Vetysyanidin viivan painelevenemän laskemiseen käytettiin HITRAN-spektrietokantaa [91] ja hiilidioksidille käytettiin Geisa-tietokantaa [92]. Doppler-levenemät voidaan laskea.

Voigtin funktion sovituksesta saadaan piikin pinta-ala ja sitä kautta konsentraatio. Konsentraatio absorboivalle yhdisteelle voidaan laskea yhtälöstä:

$$C = \frac{1}{N_A I} \int \alpha(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}, \quad (25)$$

missä C on konsentraatio yksiköissä mol cm^{-3} , N_A on Avogadron vakio, I on absorptioviivan intensiteetti yksiköissä cm molekyyli^{-1} , $\tilde{\nu}$ on siirtymää vastaava aaltoluku ja

α integroidaan yli koko absorptioviivan. Siirtymän voimakkuudet saadaan kirjallisuudesta. Konsentraatiot muutettiin ppb-yksiköihin jakamalla konsentraatio ideaalikaasun moolisella tilavuudella tutkittavassa lämpötilassa ja paineessa [93]. Virhearvio tehtiin laskemalla tuloksista keskiarvot, mediaanit ja keskipoikkeamat. Lisäksi laskettiin SPSS-ohjelmalla HCN, CO₂ ja HCN/CO₂- konsentraatioiden väliset korrelaatiot iän, sukupuolten, munuaisvaurion tyypin, diabeteksen keston, painoindeksin (engl. body mass index, BMI), ruokailun, HBA1C:n, sKOL:n, sTG:n, sHDL:n, sKREA:n ja hsCRP:n kanssa. Vertailu tehtiin käyttämällä Spearmanin korrelaatiotestiä ja Kruskal-Wallis-testiä.

8 Tulokset

Taulukoissa 5 ja 6 on esitetty kontrollihenkilöiden ja diabeetikoiden HCN-pitoisuudet ppb-yksiköissä ja hiilidioksidipitoisuudet prosentteina sekä näiden suhde. Taulukoissa on myös kummallekin yhdisteelle laskettu keskiarvo, mediaani ja keskipoikkeama. Lisäksi HCN-pitoisuuksista on piirretty kummankin henkilöjoukon osalta histogrammit kuvissa 9 ja 10. Kontrollihenkilöiden HCN-pitoisuuden mediaani oli 1,54 ppb ja diabeetikoiden 1,50 ppb. HCN-konsentraation vaihteluväli kontrollihenkilöillä oli 0,83 - 5,74 ppb ja diabeetikoilla 0,32 - 2,92 ppb.

Henkilö	HCN / ppb	CO ₂ / %	HCN / CO ₂
1	1,55	4,60	0,34
2	1,21	3,73	0,32
3	1,43	4,21	0,34
4	1,54	4,50	0,34
5	3,30	2,91	1,13
6	2,02	4,07	0,50
7	1,21	3,24	0,37
8	5,74	3,33	1,72
9	1,19	3,61	0,33
10	2,11	3,58	0,59
11	1,46	3,81	0,38
12	2,40	4,49	0,53
13	0,83	4,59	0,18
14	4,13	4,17	0,99
15	1,37	3,58	0,38
16	3,46	3,73	0,93
17	2,00	3,80	0,53
18	1,53	2,69	0,57
19	1,33	3,32	0,40
20	1,88	3,28	0,57
21	1,40	4,20	0,33
22	1,62	4,19	0,39
23	1,37	4,16	0,33
24	2,84	3,57	0,80
25	1,53	3,12	0,49
Keskiarvo	2,02	3,78	0,55
Mediaani	1,54	3,73	0,40
Keskipoikkeama	1,11	0,53	0,23

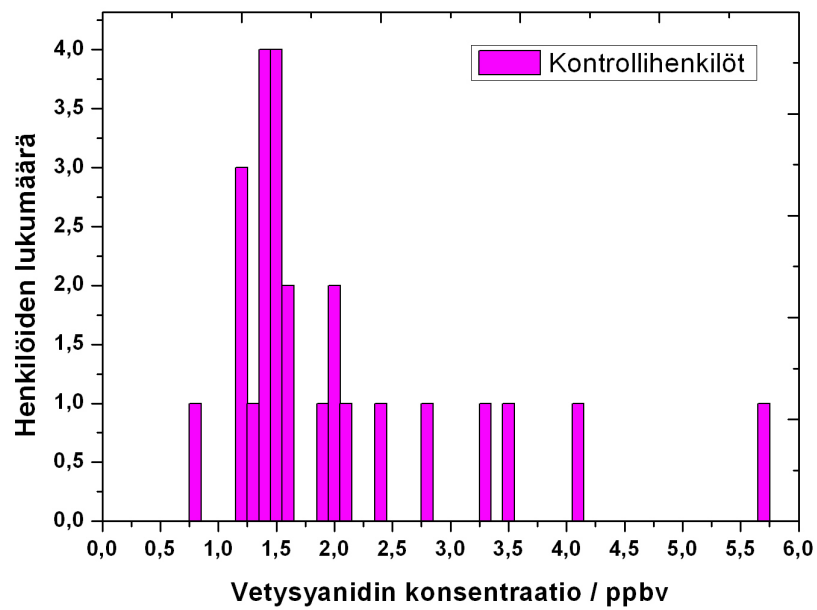
Taulukko 5: Kontrollihenkilöiden HCN- ja hiilidioksidipitoisuudet ppb- ja %-yksiköissä sekä näiden suhde. Taulukossa on myös keskiarvo, keskipoikkeama ja mediaani.

Hiilidioksidin avulla normitettujen arvojen vaihteluväli kontrollihenkilöillä on 0,18 - 1,72, mediaani 0,40, keskiarvo 0,55 ja keski-
poikkeama 0,23. Diabeetikoilla nor-
mitettu pitoisuus vaihteli välillä 0,08 - 0,93, mediaani on 0,45, keskiarvo 0,50 ja keski-
poikkeama 0,20. Tuloksia katsomalla voidaan huomata, ettei tupakointi tai syanidipi-
toisen ruuan viimeaikainen nauttiminen vaikuttanut tuloksiin. Hiilidioksidipitoisuuksien
mediaani kontrollihenkilöillä oli 3,73 % ja vaihteluväli 2,69 - 4,60 %, kun taas
diabeetikoilla mediaani oli 3,50 % ja vaihteluväli 2,10 - 4,22 %. Tulosten normalisointi
hiilidioksidin pitoisuudella mahdollistaa erikokoisten ihmisten tulosten vertailun. Nor-
mittamisen avulla voidaan myös ottaa huomioon keuhkorakkuloista tulevan ilman ja
kuolleen tilavuuden välistä suhdetta.

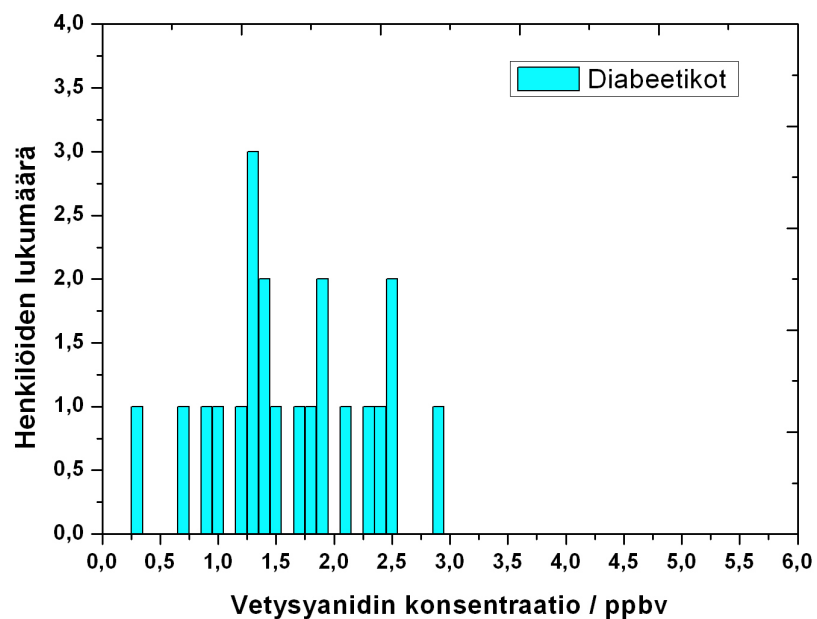
Henkilö	HCN / ppb	CO ₂ / %	HCN / CO ₂
1	1,78	3,45	0,52
2	2,48	2,85	0,85
3	2,19	4,01	0,53
4	2,41	3,54	0,65
5	2,51	2,71	0,93
6	2,28	3,50	0,08
7	0,32	3,22	0,86
8	2,92	3,40	0,70
9	1,71	3,78	0,45
10	1,93	2,98	0,65
11	1,01	3,46	0,29
12	1,88	2,10	0,90
13	1,36	3,88	0,35
14	1,41	2,98	0,47
15	0,73	3,67	0,20
16	0,87	3,89	0,22
17	1,30	4,22	0,31
18	1,50	3,52	0,43
19	1,18	3,61	0,33
20	1,31	3,14	0,42
21	1,33	3,56	0,37
Keskiarvo	1,64	3,40	0,50
Mediaani	1,50	3,50	0,45
Keski- poikkeama	0,66	0,49	0,20

Taulukko 6: Diabetes-potilaiden HCN- ja hiilidioksidipitoisuudet ppb- ja %-yksiköissä. Taulukossa on myös keskiarvo, keski-
poikkeama ja mediaani.

Kun laskettiin diabetespotilaiden korrelaatiot HCN-, CO₂- ja HCN/CO₂- kon-



Kuva 9: Kontrollihenkilöiden HCN-konsentraatiojakauma.



Kuva 10: Diabetespotilaiden HCN-konsentraatiojakauma.

sentraatioiden ja iän, sukupuolten, munuaisvaurion tyyppin, diabeteksen keston, painoindeksin (engl. body mass index, BMI), HbA_{1c}:n, sKOL:n, sTG:n, sHDL:n, sKREA:n ja hsCRP:n välillä, havaittiin selvä negatiivinen korrelaatio iän ja HCN-konsentraation

välillä kummassakin henkilökoukossa ($R=-0,370$ ja merkittävyys $0,011$). Tulos tarkoittaa sitä, että korkeimmat pitoisuudet mitataan nuorilta henkilöiltä. Eri sukupuolten välillä ei ollut merkittävää eroa HCN-konsentraatioissa, mutta hiilidioksin pitoisuus oli naisilla pienempi kuin miehillä. Poistamalla diabetespotilaiden joukosta henkilön numero 15, jonka HbA_{1c} -arvo poikkesi muista potilaista, havaittiin negatiivinen korrelaatio iän ja HCN-konsentraation välillä ($R=-0,520$, merkittävyys $0,019$) sekä sHDL:n ja HCN-konsentraation välillä ($R=-0,486$, merkittävyys $0,035$). Lisäksi havaittiin positiivinen korrelaatio HCN-konsentraation ja HbA_{1c} :n välillä ($R=0,529$, merkittävyys $0,020$). Munuaisvaurion tyyppillä ei puolestaan ollut yhteyttä HCN-konsentraatioihin.

9 Yhteenveto ja johtopäätökset

Hengityksen mittaaminen on turvallista sekä potilaalle että näytteenottajalle ja se on veri- tai virtsanäytteiden ottamiseen verrattuna miellyttävä ja helppo; potilaalta ei vaadita muuta kuin hengittämistä. Hengitysnäytteen kerääminen on niin helppoa, että sen voi tehdä esimerkiksi kokematon sairaanhoitaja potilaan huoneessa tai jopa potilas itse. Hengitysanalyysiä voidaan käyttää sairauksien määrittämiseen, sairauden etenemisen seurantaan tai lääkehoidon seurantaan. Helppoutensa vuoksi voidaan tutkia suuria määriä potilaita kerralla. Se ei ole kuitenkaan saavuttanut laajempaa käyttöä monista syistä johtuen.

Vaikka hengitysnäytteenotto on helppoa, on laitteissa vielä paljon puutteita. Paras laite ainakin sairaalakäyttöön on kannettava, mahdollisimman pieni, helppokäyttöinen, edullinen ja reaaliaikaiseen mittaamiseen kykenevä. Toisaalta, kuten edellä kävi ilmi, hengityksen mittaamisessa on otettava huomioon paljon erilaisia asioita. Näitä ovat esimerkiksi ympäröivän ilman aiheuttama kontaminaatio, tupakointi ja muiden molekyylien aiheuttamat häiriöt. Myös sopivien sairauksiin viittaavien biomerkkiaineiden löytäminen ja näiden biokemiallisen alkuperän ymmärtäminen hidastavat hengitysanalyysin kehittymistä. Hengitysanalyysiä mainostetaan usein kehoon kajoamattomana menetelmänä, mutta myös virtsan, syljen tai hiusten kerääminen eivät kajoa elimistöön. Hengitystä voidaan kuitenkin kerätä lähes rajattomasti, toisin kuin esimerkiksi hiuksia tai virtsaa.

Tässä tutkielmassa mitattiin terveiden ihmisten ja diabeetikoiden uloshengitysilman HCN-pitoisuuksia CRDS-laitteistolla. Tutkimus on tiettävästi ensimmäinen, jossa tutkitaan diabeetikoiden uloshengitysilman HCN-pitoisuuksia. Diabeetikoiden pitoisuudet eivät erityisemmin poikenneet terveiden ihmisten pitoisuuksista, sillä osa terveiden ihmisten pitoisuuksista on jopa korkeampia kuin diabeetikoilla ja kummankin tutkimusryhmän mediaanit ovat käytännössä lähes samoja (1,50 ja 1,54 ppbv). Tuloksissa on kuitenkin huomioitava, että kontrolliryhmässä oli enemmän nuoria kuin diabeetikoiden joukossa. Nuorilla henkilöillä näyttäisi tulosten mukaan olevan vanhempia korkeammat HCN-pitoisuudet uloshengitysilmassa. Tulokset ovat verrattavissa aiempiin tutkimuksiin, joissa on mitattu terveiden ihmisten uloshengitysilman HCN-

pitoisuuksia. Esimerkiksi Schmidt et al. määrittivät tutkimuksessaan, että nenän kautta hengitettäessä HCN-pitoisuus vaihtelee välillä 0,7 - 3,2 ppbv mediaanin ollessa 1,3 ppbv. Toisaalta tuossa tutkimuksessa näytteet mitattiin suoraan laitteeseen hengittämällä, eikä näytepussista. [22]

Veren seerumista mitattu HbA_{1c} korreloi negatiivisesti HCN-konsentraation kanssa silloin, kun poistetaan henkilö 15 diabetespotilaiden joukosta. Lisäksi seerumin sHDL korreloi positiivisesti HCN-pitoisuuden kanssa. Tulos voisi olla mielenkiintoinen, sillä FinnDiane-tutkimuksissa on havaittu, että kohonneet veren rasvat (triglyseridit ja HDL) ja glykohemoglobiini HbA_{1c} ennustavat tulevaa munuaistautia, varsinkin miehillä. Lisäksi HbA_{1c} on tärkeä diabeteksen omahoidon seurannassa, sillä sen arvo kertoo omahoidon onnistumisesta [85]. Ongelmana on kuitenkin, että ikä korreloi myös negatiivisesti HCN-pitoisuuden kanssa ($R = -0,370$ ja merkittävyys 0,011) ja se selittää ehkä siksi tällaiset tulokset. Munuaisvaurion tyyppillä ei myöskään ollut vaikutusta HCN-pitoisuuksiin.

Vaikka oma tutkimukseni antaa viitteitä siitä, että diabeetikoiden HCN-pitoisuudet eivät poikkea erityisemmin terveiden ihmisten pitoisuuksista, on kuitenkin syytä huomata, että esimerkiksi Enderby et al. ovat havainneet kohonneita HCN-pitoisuuksia lapsilla, jotka sairastavat kystistä fibroosia [74]. Näistä lapsista kaikilla paitsi kahdella oli PA- bakteerin aiheuttama infektio hengitysteissä ja HCN-pitoisuuden vaihteluväli oli 0 - 68 ppb. Toisaalta näytteet on otettu suun kautta, mikä saattaa selittää tutkimustamme korkeammat pitoisuudet. Lisäksi lasten infektio on hengitysteissä, kun taas omaan tutkimukseeni osallistuneilla diabeetikoilla PA-infektio on munuaisissa.

Tutkimuksessani potilaita oli vain 21, joista vain yhdelle oli tehty munuaissiirto. Myöskään siksi ei voida varmasti sanoa, soveltuuko HCN biomerkkiaineeksi PA-infektoituneiden diabeetikoiden määrittämiseen. Jotta lopullinen johtopäätös voidaan tehdä, on tutkittava huomattavasti useampaa infektoitunutta diabeetikkoa ja vanhempaa kontrollihenkilöä. PA- bakteeri infektoi useita kudostyyppejä, kuten esimerkiksi ihoa. Diabeetikoilla ihoinfektiot ovat melko yleisiä, minkä vuoksi CRDS-laitteiston avulla voitaisiin myös mitata PA-bakteerin infektoiman ihon pinnalta näytteitä vetysy-

anidin toteamiseksi samaan tapaan, kuin esimerkiksi Schmidt et al. mittasivat terveiden ihmisten iholta vetysyanidipitoisuuksia [22]. Käytännössä tämä vaatisi vielä kannettavan laitteen puuttuessa diabeetikoiden saapumista laboratorioon, mikä voi olla mahdotonta esimerkiksi vuodepotilaiden osalta.

Kiitospuhe

Ensimmäisenä haluan sanoa kiitokset Olavi Vaittiselle, joka otti minut kesätöihin vuonna 2010 ja mahdollisti tutustumisen hengitysanalyysiin, laserspektroskopiaan ja fyysikaalisen kemian laboratorion henkilökuntaan. Erityiskiitos myös Markus Metsälälle, Florian Schmidtille ja Lauri Haloselle, jotka ovat antaneet minulle mahdollisuuden työskennellä hengitysanalyysin parissa. Olette olleet hyvänä esimerkkinä minulle erittäin asiantuntevina ja urastaan kiinnostuneina tutkijoina. Haluan myös kiittää erityisesti fyysikaalisen kemian laboratorion henkilökunnasta Sallaa, Elinaa, Teemua, Hannua, Richardia, Paulia, Jaria ja Villeä vapaa-ajan yhteisistä toiminnoista. Ilman teitä en olisi täältä valmistunut. Kiitos, että olette jaksaneet kannustaa ja auttaa minua opinnoisani eteenpäin vaikeinakin hetkinä. Varsinkin Elinan, Teemun ja Richardin tietokone-aidot ovat pelastaneet minut monilta ongelmilta. Hannulle erityiskiitos siitä, että olet tuonut keskuuteemme lisäväriä aina chilin syönnistä junaharrastuksiin.

Lopuksi haluan vielä kiittää omaa perhettäni, ystäviäni ja puolisoani Markusta siitä, että olette ymmärtäneet ja kannustaneet minua myös silloin, kun aikani on ollut vähissä. Kiitokset teille siitä, että olen teidän kanssanne saanut unohtaa hetkeksi opiskelun tuomat paineet. Kiitos myös FinnDiane-projektin henkilökunnalle yhteistyöstä.

Viitteet

- [1] Pauling L., Robinson A. B., Teranishi R. ja Cary P. Quantitative analysis of urine vapour and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. (1971) **68**: 2374 - 2376.
- [2] Logan R., Dill S., Bauer F. E., Walker M., Hirschl A., Gummet P., Good D. ja Mossi S. The European ¹³C-urea breath test for the detection of *Helicobacter Pylori*. (1991) *European journal of gastroenterology and hepatology* **3**.
- [3] King J., Unterkofler K., Teschl G., Teschl S., Mochalski P., Koc H., Hinterhuber H ja Amann A. A modeling-based evaluation of isothermal rebreathing for breath gas analyses of highly soluble volatile organic compounds. *Journal of breath research* (2012) **6** 016005.
- [4] Sulway M. J. ja Malins J. M. Acetone in diabetic ketoacidosis. (1970) *Lancet* **296**: 736 - 740.
- [5] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>
- [6] <http://www.diabetes.fi/diabetestietoa>
- [7] Parkins M. D., Gregson D. B., Pitout J. D., Ross J. D. ja Laupland K. B. Population-based study of the epidemiology and the risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection. *Infection*. (2010) **38**: 25 - 32.
- [8] Carroll W., Lenney W., Wang T. S., Španěl P., Alcock A. ja Smith D. Detection of volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* using selected ion flow tube mass spectrometry. *Pediatrics pulmonology*. (2005) **39**: 452 - 456.
- [9] Španěl P., Dryahina K. ja Smith D. Acetone, ammonia and hydrogen cyanide in exhaled breath of several volunteers aged 4-83 years. *Journal of breath research*. (2007) **1** 011001.
- [10] Risby T. H. ja Solga S. F. Current status of clinical breath analysis. *Applied Physics* (2006) **85**: 421 - 426.

- [11] George S. ja Hlastala M. Airway gas exchange and exhaled biomarkers. *Comprehensive physiology* (2011) **1** 10.1002.w
- [12] Kuva otettu sivulta <http://z.cotot.com/hoidot/rintakehan-rontgenkuvaus> ja tekstit muokattu suomenkieliseksi.
- [13] Kuva otettu sivulta http://www.teachpe.com/anatomy/respiratory_system.php ja teksti muokattu suomenkieliseksi.
- [14] Arthurs G. ja Sudhakar M. Carbon dioxide transport. *Continuing education in anaesthesia, critical care and pain* (2005) **5** 213 - 214.
- [15] Atkins P. W. Physical chemistry. Oxford university press 5. painos (1994).
- [16] Fahri L. Elimination of inert gas by the lung. *Respiration Physiology* (1967) **3**: 1 - 11.
- [17] Anderson J. ja Hlastala M. Breath tests and airway gas exchange. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* (2007) **20**: 112 - 117.
- [18] Francesco F., Fuoco R., Trivella M. ja Ceccarini A. Breath analysis: trends in techniques and clinical applications. (2005) *Microchemical journal* **79**: 405 - 410.
- [19] Recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children- 1999. (1999) *American journal of respiratory and critical care medicine* **160**: 2104 - 2117.
- [20] Stick S. M. Non-invasive monitoring of airway inflammation. *Medical Journal of Australia* (2002) **177**: S59 - S60.
- [21] Cope K., Watson M., Foster W., Schnert S. ja Risby T. Effects of ventilation on the collection of exhaled breath in humans. (2004) *Journal of applied physiology* **96**: 1371 - 1379.
- [22] Schmidt F., Metsälä M., Vaittinen O. ja Halonen L. Background levels and diurnal variations of hydrogen cyanide in breath and emitted from skin. (2011) *Journal of breath research* **5** 046004.

- [23] Wang T., Pysanen A., Dryahina K., Španěl P. ja Smith D. Analysis of breath, exhaled via mouth and nose, and the air in the oral cavity. (2008) *Journal of breath research* **2** 037013.
- [24] Beauchamp J., Herbig J., Gutmann R. ja Hansel A. On the use of Tedlar bags for breath gas sampling and analysis. (2008) *Journal of breath research* **2** 046001.
- [25] Risby T. ja Sehnert S. Clinical application of breath biomarkers of oxidative stress status. *Free radical biology and medicine* (1999) **27**: 1182 - 1192.
- [26] Mutlu G., Garey K., Robbins R., Danziger L. ja Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. (2001) *American journal of respiratory and critical care medicine* **164**: 731 - 737.
- [27] Riekkola M. ja Hyötyläinen T. *Kolonnikromatografia ja kapillaarielektromigraatiotekniikat* Helsingin yliopisto, 2. painos, 2002.
- [28] Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VCH: New York, 1997.
- [29] Kubista J., Španěl P., Dryahina K., Workman C. ja Smith, D. Combined use of gas chromatography and selected ion flow tube mass spectrometry for absolute trace gas quantification. (2006) *Rapid communications in mass spectrometry* **20**: 563 - 567.
- [30] Smith D. ja Španěl P. Application of ion chemistry and the SIFT technique to the quantitative analysis of trace gases in air and on breath. (1996) *International Reviews In Physical Chemistry* **15**: 231 - 271.
- [31] Smith D. ja Španěl P. Direct, rapid quantitative analyses of BVOCs using SIFT-MS and PTR-MS obviating sample collection. (2011) *Trends in analytical chemistry* **30**: 945 - 959.
- [32] Amann A., Španěl P. ja Smith D. Breath analysis: The approach towards clinical applications. (2007) *Mini-reviews in medicinal chemistry* **7**: 115 - 129.
- [33] Hansel A., Jordan A., Warneke C., Holzinger R. ja Lindinger W. Improved detection limit of the proton-transfer reaction mass spectrometer: on-line monitoring

- of volatile organic compounds at mixing ratios of a few pptv. (1998) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **12**: 871 - 875.
- [34] Rabis T., Sommerwerck U., Anhenn O., Darwiche K., Freitag L., Teschler H., Bödeker B., Maddula S. ja Baumbach. Detection of infectious agents in the airways by ion mobility spectrometry of exhaled breath. (2011) *International journal for ion mobility spectrometry* **14**: 187 - 195.
- [35] Turner A. ja Magan N. Electronic noses and disease diagnostics. (2004) *Nature reviews microbiology* **2**: 161 - 166.
- [36] Pavlou A., Magan N., Sharp D., Brown J., Barr H. ja Turner A. An intelligent rapid odour recognition model in discrimination of *Helicobacter pylori* and other gastroesophageal isolates *in vitro*. (2000) *Biosensors and Bioelectronics* **15**: 333 - 342.
- [37] Di Natale C., Magagnano A., Martinelli E., Paolesse R., D'Arcangelo G. ja Roscioni C. Lung cancer identification by analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors.(2003) *Biosensors and Bioelectronics* **18**: 1209 - 1218.
- [38] Ping W., Haibao X. ja Farong S. A novel method for diabetes diagnosis based on electronic nose. (1997) *Biosensors and Bioelectronics* **12**: 1031 - 1036.
- [39] Thermo electron corporation, Environmental instruments. MIRAN 205B Series SapphIRe Portable ambient air analyzers, Instruction manual P/N BK3538. (1 Jun 2004)
- [40] Vaittinen O., Schmidt F., Metsälä M. ja Halonen L. Exhaled breath biomonitoring using laser spectroscopy. (2013) *Current analytical chemistry* **9**
- [41] Berden G. ja Engeln R. *Cavity Ring Down Spectroscopy: Techniques and Applications*. Wiley-Blackwell 1.painos, 2009.
- [42] Berden G., Peeters R. ja Meijer G. Cavity ring-down spectroscopy: Experimental schemes and applications. (2000) *International reviews in physical chemistry* **19**: 565 - 607.
- [43] <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=45618>

- [44] <http://www.fda.gov/http://www.fda.gov/>
- [45] <http://www.helico.com/?q=BreathTests>
- [46] Perman J. A. Clinical application of breath hydrogen measurements. (1991) *Canadian journal of physiology and pharmacology* **69**: 111 - 115.
- [47] Krauss B. ja Hess D. Capnography for Procedural Sedation and Analgesia in the Emergency Department. (2007) *Annals of emergency medicine* **50**: 172 - 181.
- [48] Kharitonov S., Yates D., Robbins R., Logan-Sinclair R., Shinebourne E. ja Barnes P. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. (1994) *The Lancet* **343**: 133 - 135.
- [49] Di Francesco F., Fuoco R., Trivella M. G. ja Ceccarini A. Breath analysis: trends in techniques and clinical applications. (2005) *Microchemical Journal* **79**: 405 - 410.
- [50] Hietanen E., Bartsch H., Bereziat J., Camus A., McClinton S., Eremin O., Davidson L. ja Boyle P. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. (1994) *European journal of clinical nutrition* **48** 575 - 586.
- [51] Sobotka P., Gupta D., Lansky D., Costanzo M. ja Zarling E. Breath pentane is a marker of acute cardiac allograft rejection. (1994) *The journal of heart and lung transplantation* **13**: 224 - 229.
- [52] Olopade C., Zakkar M., Swedler W. ja Rubinstein I. Exhaled pentane levels in acute asthma. (1997) *Chest* **111**: 862 - 865.
- [53] Phillips M., Cataneo R., Ditkoff B., Fisher P., Greenberg J., Gunawardena R., Kwon C., Tietje O. ja Wong C. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. (2006) *Breast Cancer Research and Treatment* **99**: 19 - 21.
- [54] Hlastala M. ja Anderson J. The impact of breathing pattern and lung size on the alcohol breath test. (2007) *Annals of biomedical engineering* **35**: 264 - 272.

- [55] World health organization and international programme on chemical safety. Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects. (2004) World health organization, Geneva.
- [56] Musshoff F., Schmidt P., Daldrup T. ja Madea B. Cyanide fatalities: case studies of four suicides and one homicide. (2002) *American journal of forensic medicine and pathology* **23**: 315 - 320.
- [57] Stevenson R. N., Kingswood C., Cohen S. L. ja Vesey C. J. Cyanide and fire victims. (1988) *Lancet* **2**: 1145.
- [58] Fiksel J., Cooper C., Eschenroeder A., Goyer M. ja Perwak J. Exposure and risk assessment for cyanide. Washington, DC, US Environmental Protection Agency (EPA/440/4-85/008; NTIS PB85-220572).
- [59] Cicerone R. ja Zellner R. The atmospheric chemistry of hydrogen cyanide (HCN). (1983) *Journal of Geophysical Research* **88**: 689 – 696.
- [60] Way J. L. Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism. (1984) *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **24**: 451 – 481.
- [61] Li Q., Jacob D. J., Bey I., Yantosch R. M., Zhao Y., Kondo Y. ja Notholt J. Atmospheric hydrogen cyanide (HCN): Biomass burning source, ocean sink? (2000) *Geophysical Research Letters* **27**: 357 – 360.
- [62] JECFA (1993) Cyanogenic glycosides. In: Toxicological evaluation of certain food additives and naturally occurring toxicants. Geneva, World Health Organization, 39th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO Food Additives Series 30). Available at <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je18.htm>.
- [63] Sharma R. P. Cyanide containing foods and potential for fetal malformations. In: Sharma RP, ed. *Dietary factors and birth defects*. San Francisco, CA, American Association for the Advancement of Science, Pacific Division, (1993) pp. 332–348.
- [64] Padmaja G. Cyanide detoxification in cassava for food and feed use. (1995) *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition* **35**: 259 – 339.

- [65] ATSDR (1997) Toxicological profile for cyanide. Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- [66] Carotti A. ja Kaiser E. Concentrations of twenty gaseous chemical species in the flue gas of a municipal incinerator. (1972) *Journal of the Air Pollution Control Association* **22**: 224 – 253.
- [67] Eisler R., Clarke D., Wiemeyer S. ja Henry C. (1999) Sodium cyanide hazards to fish and other wildlife from gold mining operations. In: Azcue JM, ed. Environmental impacts of mining activities. Berlin, Springer, pp. 55–67.
- [68] Purser D. Toxic products yields and hazard assessment for fully enclosed design fires. (2000) *Polymer international* **49**: 1232 - 1255.
- [69] Stamyk K., Nord P. ja Johanson G. Washout kinetics of inhaled hydrogen cyanide in breath. (2008) *Toxicology Letters* **179**: 59 - 62.
- [70] Tian Y., Dasgupta P., Mahon S., Ma J., Brenner M., Wang J-H. ja Boss G. A disposable blood cyanide sensor. (2013) *Analytica Chimica Acta* **768**: 129 - 135.
- [71] K. Stamyk ja G. Johanson. *Physiologically-based toxicokinetic modeling of hydrogen cyanide levels in human breath*. Väitöskirja, Karoliininen instituutti, Tukholma, 2011.
- [72] Castric P. A. Hydrogen cyanide as a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. (1975) *Canadian journal of microbiology* **21**: 613 - 618.
- [73] Nelson L. Acute cyanide toxicity: mechanisms and manifestations. (2006) *Journal of emergency nursing* **32**: S8 - S11.
- [74] Enderby B., Smith D., Carroll W. ja Lenney W. Hydrogen cyanide as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the breath of children with cystic fibrosis. (2009) *Pediatric pulmonology* **44**: 142 - 147.
- [75] Lechner M., Karlseder A., Niederseer D., Lirk P., Neher A., Rieder J. ja Tilg H. *H. Pylori* infection increases levels of exhaled nitrate. (2005) *Helicobacter* **10**: 385 - 390.

- [76] Stelmaszynska T. Formation of HCN by human phagocytosing neutrophils - 1. Chlorination of *Staphylococcus epidermidis* as a source of HCN. (1985) *International journal of biochemistry* **17**: 373 - 379.
- [77] Paredi P., Biernacki W., Invernizzi G., Kharitonov S. ja Barnes P. Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease? (1999) *Chest* **116**: 1007 - 1011.
- [78] Dillon E. L., Janghorbani M., Angel J. A., Casperson S. L., Grady J. J. Urban R. J., Volpi E. ja Sheffield-Moore M. Novel noninvasive breath test method for screening individuals at risk for diabetes. (2009) *Diabetes care* **32**: 430 - 435.
- [79] Phillips M., Cataneo R. N., Cheema T., Greenberg J. Increased breath biomarkers of oxidative stress in diabetes mellitus. (2004) *Clinica chimica acta* **344**: 189 - 194.
- [80] Galassetti P., Novak B., Nemet D., Rose-Gottron C., Cooper D., Meinardi S., Newcomb R., Zaldivar F. ja Blake D. Breath ethanol and acetone as indicators of serum glucose levels: an initial report. (2005) *Diabetes technology & therapeutics* **7**: 115 - 123.
- [81] Wierusz-Wysocka B., Wysocki H., Byks H., Zozulinska D., Wykretowicz A. ja Kazmierczak M. Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. (1995) *Diabetes research and clinical practice* **27**: 193 - 197.
- [82] Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes (1999) *Diabetes/metabolism research and reviews* **15**: 412 - 426.
- [83] Kalapos M. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. (2003) *Biochimica et biophysica acta - General subjects* **1621**: 122 - 139.
- [84] Greiter M., Keck L., Siegmund T., Hoeschen C., Oeh U. ja Paretzke H. Differences in exhaled gas profiles between patients with type 2 diabetes and healthy controls. (2010) *Diabetes & technology* **12**: 455 - 463.
- [85] <http://www.finndiane.fi/>

- [86] Gilchrist F., Razavi C., Webb A., Jones A., Španěl P., Smith D. ja Lenney W. An investigation of suitable bag materials for the collection and storage of breath samples containing hydrogen cyanide. (2012) *Journal of breath research* **6**: 036004.
- [87] Schmidt F. M., Vaittinen O., Metsälä M., Kraus P. ja Halonen L. Direct detection of acetylene in air by continuous wave cavity ring-down spectroscopy. (2010) *Journal of applied physics* **101**: 671 - 682.
- [88] Griffiths P. ja Haseth J. Fourier transform infrared spectrometry. 2. painos, John Wiley & Sons Inc., 2007.
- [89] Ouyang X. ja Varghese P. Reliable and efficient program for fitting Galatry and Voigt profiles to spectral data on multiple lines. (1989) *Applied Optics* **28**: 1538 - 1545.8
- [90] Wojdyr M. Fityk: a general-purpose peak fitting program. (2010) *Journal of applied crystallography* **43**: 1126 - 1128.
- [91] HITRAN2008www.hitran.com
- [92] Geisa2009ether.ips1.jussieu.fr
- [93] Stamyra K., Vaittinen O., Jaakola J., Guss J., Metsälä M., Johanson G. ja Halonen L. Background levels of hydrogen cyanide in human breath measured by infrared cavity ring down spectroscopy. (2009) *Biomarkers* **14**: 285 - 291.
- [94] Martinez R. Z., Metsälä M., Vaittinen O., Lantta T. and Halonen L. Laser-locked, high-repetition-rate cavity ringdown spectrometer. (2006) *Journal of the Optical Society of America B* **23**: 727 - 740.