

电喷雾萃取电离质谱直接检测人体呼出气体中的乙腈

张燕¹ 潘素素¹ 朱志强¹ 张兴磊¹ 徐高四²
魏益平² 陈焕文¹ 丁健桦^{*1}

¹(东华理工大学江西省质谱科学与仪器重点实验室,南昌 330013)

²(南昌大学第二附属医院,南昌 330006)

摘要 人体呼出气体携带大量的生理病理信息,在临床诊断和代谢组学研究中发挥着日益重要的作用。本研究在未对样品进行预处理条件下,采用电喷雾萃取电离质谱(EESI-MS)技术直接测定呼出气体中乙腈分子。在优化的实验条件下,结合多级串联质谱,有效地获得了人体呼出气体中乙腈含量的信息。对气相乙腈的检出限为 5.71 pL/L,线性范围为 76.4 ~ 1910 pL/L。以两名健康志愿者呼出气体为实例,实际检测了其中乙腈的含量分别为 134.49 和 104.40 pL/L,相对标准偏差(RSD)分别为 6.3% 和 7.2%。结果表明,本方法灵敏度高、精密度好、分析速度快、特异性强,能够承受呼出气体中复杂基体的影响,适合于呼出气体中痕量乙腈的直接半定量检测,也可为呼出气体中其它小分子物质的检测提供新思路。

关键词 电喷雾萃取电离-质谱;乙腈;呼出气体

1 引言

近年来,呼出气体检测凭借其无损、快速、取样方便等优势,及其中的生物标记物分子与疾病(如肺癌^[1,2])、新陈代谢^[3,4]、脏器状况^[5]的相关性,逐渐成为现代临床医学、分析检测领域研究的热点。有研究表明,乙腈可作为吸烟的标志物^[6],随着吸烟数量的增加,吸烟者呼出气体中乙腈的含量迅速升高,即使是被动吸烟者,其呼出的乙腈含量也明显高于正常对照组^[7,8]。据报道,乙腈还与吸毒成瘾^[9,10]、膀胱癌^[11]等有一定关系。因此,建立一种实时在线、灵敏、快速、准确的呼出气体中乙腈的检测方法,对乙腈在人体中的代谢及其在人体生理病理中所产生的作用的研究具有重要意义。

乙腈分子检测的常规方法有气相色谱法(GC)^[12,13]和气相色谱-质谱法(GC-MS)^[14,15]。但因灵敏度低,GC及GC-MS法很难对呼出气体中乙腈进行直接快速原位检测。选择离子流动管质谱法(Selection flow tube mass spectrometry, SIFT-MS)^[16]和质子转移反应质谱法(Proton transfer reaction mass spectrometry, PTR-MS)^[17,18]已用于呼出气体中乙腈的检测。但SIFT-MS法需对呼出气体进行收集和预处理,且灵敏度不高,难以实现乙腈的实时在线分析;而PTR-MS法虽可进行呼吸气体在线分析,但由于乙腈分子较难质子化^[19],对仪器的要求更高。加之,呼出气体基体成分复杂(含氮、氧、水、挥发性/非挥发性有机化合物等),受环境的影响较大^[20],检测结果的准确性受到了一定限制。EESI-MS^[21,22]是一种适合于复杂基体样品分析的新兴离子化技术,它能将中性样品和带电试剂离子分开,并在线完成样品的萃取和电离,适宜于对样品进行活体、直接、实时检测。本研究利用其具有可调三维空间、方便更换萃取试剂及保证人身安全等优点,以硝酸银为萃取溶剂,在无需样品预处理条件下直接对呼出气体中乙腈进行快速质谱定性及半定量分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

EESI 离子源:东华理工大学研制^[23]。LTQ-XL 增强型线性离子阱质谱仪(美国 Finnigan 公司),配有 Xcalibur 数据系统。KQ3200 型超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司);精密电子天平(Mettler Toledo

2012-10-29 收稿;2013-01-17 接受

本文系国家自然科学基金(Nos.21265002, 21105010)和江西省科技支撑计划(Nos. 2010BSA10200, 2010DD01300)资助

* E-mail: dingjianh2004@126.com

公司)。甲醇(色谱纯,SK Chemicals公司); AgNO_3 (分析纯,天津市大茂化学试剂厂);乙腈(色谱纯,Dikma Technologies公司),水为实验室自制超纯水。用水配制1 mg/L乙腈标准储备液。用甲醇配制10 mg/L AgNO_3 溶液,作为喷雾萃取溶剂。呼出气体样品来自健康志愿者。

2.2 实验方法

以超纯水梯度稀释乙腈标准储备液至50, 100, 250, 500, 1000和2500 nL/L各250 mL,分别置于300 mL干净、干燥的锥形瓶中。用带有两支特氟龙通气管(内径2 mm, 外径4 mm)的橡皮塞密封住盛有标准溶液的锥形瓶,其中一支通入乙腈溶液液面下2 cm,该气管上端连接一个控制阀,以控制惰性气体(N_2)的流速;另一支则位于液面上方,将液面上的空气(含乙腈分子)通过转子流量计引入EESI离子源,流速为0.8 L/min。乙腈分子与来自EESI另一通道的试剂 Ag^+ 碰撞,形成 $[^{107/109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 离子,进入质谱被检测。

采用气液转换公式^[22]计算引入EESI离子源的乙腈浓度:

$$c_g = \frac{k_n \cdot m_w \cdot c_l}{P_t \cdot m_n \cdot d_w} \cdot \frac{m_n}{V} = \frac{k_n \cdot m_w \cdot c_l}{P_t \cdot V \cdot d_w}$$

其中, c_g 是锥形瓶内空气中乙腈浓度(pL/L),即引入EESI离子源的乙腈浓度; k_n 是乙腈(在水中)在实验温度(25 °C)下的亨利常数,可取为 $k_n = 1.05 \times 10^5 \text{ Pa}^{[24]}$; m_w 是水的摩尔质量,即 $m_w = 18 \text{ g/mol}$; c_l 是液相乙腈浓度(nL/L); P_t 是锥形瓶内气体总压,这里取值为 $P_t = 1.10 \times 10^5 \text{ Pa}$; V 是乙腈在实验条件(298 K, $1.10 \times 10^5 \text{ Pa}$)下的摩尔体积, $V = 22.5 \text{ L/mol}$; d_w 是实验温度下水的密度(1 g/mL)。由此可得关系式 $c_g(\text{pL/L}) = 0.764c_l(\text{nL/L})$ 。根据所配制的乙腈水溶液浓度,计算得到相应的气相乙腈浓度,列于表1。

2.3 实验条件

实验采用正离子检测模式,质量范围50~300 Da;雾化气(N_2)压力为1.4 MPa;质谱离子传输管温度为300 °C;喷雾电压为3.5 kV; AgNO_3 甲醇溶液为喷雾溶剂,流速为2 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。 $[^{107}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 和 $[^{109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 的碰撞诱导解离(Collision induced dissociation, CID)能量分别为14%和16%,碰撞持续时间分别为300和60ms。其它实验参数由系统自动优化。需要注意的是,因实验采用10 mg/L AgNO_3 甲醇溶液,为防止 Ag^+ 对仪器的污染和损伤,喷雾溶剂通道与水平面夹角为90°,溶剂喷雾口与质谱口距离为0.3 cm;为保证样品分子最大限度与试剂离子进行碰撞并发生反应,两喷雾通道夹角保持120°,样品喷雾口与质谱入口距离为0.5 cm,如图1所示;进行样品检测时,为防止呼出气体中待测物分子冷凝于样品通道管壁上,采用加热/恒温装置,使样品传输管温度保持在85 °C。

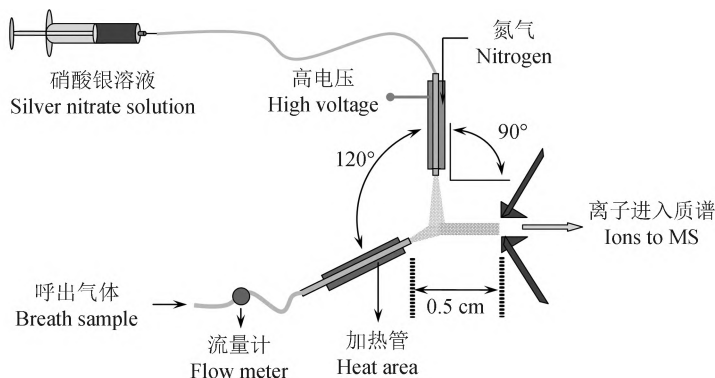


图1 呼出气体中乙腈检测的EESI-MS装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS) for acetonitrile analysis in breath

表1 乙腈标准水溶液液相浓度对应其气相浓度数值表
Table 1 Concentration of standard acetonitrile solution in the gas and liquid phase

$c_l(\text{nL/L})$	50.0	100.0	250.0	500.0	1000.0	2500.0
$c_g(\text{pL/L})$	38.2	76.4	191.0	382.0	764.0	1910.0

3 结果与讨论

3.1 乙腈标准品的 EESI-MS 分析

在一级质谱图中(图 2a),得到相对丰度为 25% 的离子峰 m/z 107 (Ag^+) 和 m/z 109 (Ag^+ 同位素), 丰度比接近 1:1, 这与银的天然丰度(^{107}Ag : 51.35%; ^{109}Ag : 48.65%) 比近似^[25]。

质谱峰 m/z 148 (丰度为 100%) 和 m/z 150, 分别为 $[\text{}^{107}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 和 $[\text{}^{109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 。因 EESI 是在敞开的三维空间环境中进行的电离、萃取及荷/能传递, 外部环境对实验结果干扰较大, 为排除假阳性, 需采用串联质谱进一步确认。分别选择 m/z 148 和 150 为母离子, 得到碎片离子 m/z 107 和 109, 均为母离子丢失一个 CH_3CN 分子得到(如图 2b)。

一级谱图中还有丰度为 50% 的 m/z 166 和 168。选择 m/z 166 为母离子进行二级质谱分析, 得到碎片离子 m/z 148, 为母离子丢失一个 H_2O 分子(图 2c); 进一步以碎片离子 m/z 148 为母离子作三级质谱分析, 得到离子 m/z 107(图 2c 及插图), 即母体继续丢失一个 CH_3CN 分子。同样地, 对 m/z 168 进行分析, 确认其为 $^{109}\text{Ag}^+$ 结合 H_2O 和 CH_3CN 分子得到。因而可确认 m/z 166 和 168 分别为 $[\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3\text{CN}+^{107}\text{Ag}]^+$ 和 $[\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3\text{CN}+^{109}\text{Ag}]^+$ 。

一级谱图中还可看到 m/z 189 和 191, 通过二、三级质谱分析可归属 m/z 189 为 $[\text{}^{107}\text{Ag}+2\text{CH}_3\text{CN}]^+$ (图 2d 及插图) 及 m/z 191 为 $[\text{}^{109}\text{Ag}+2\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 。

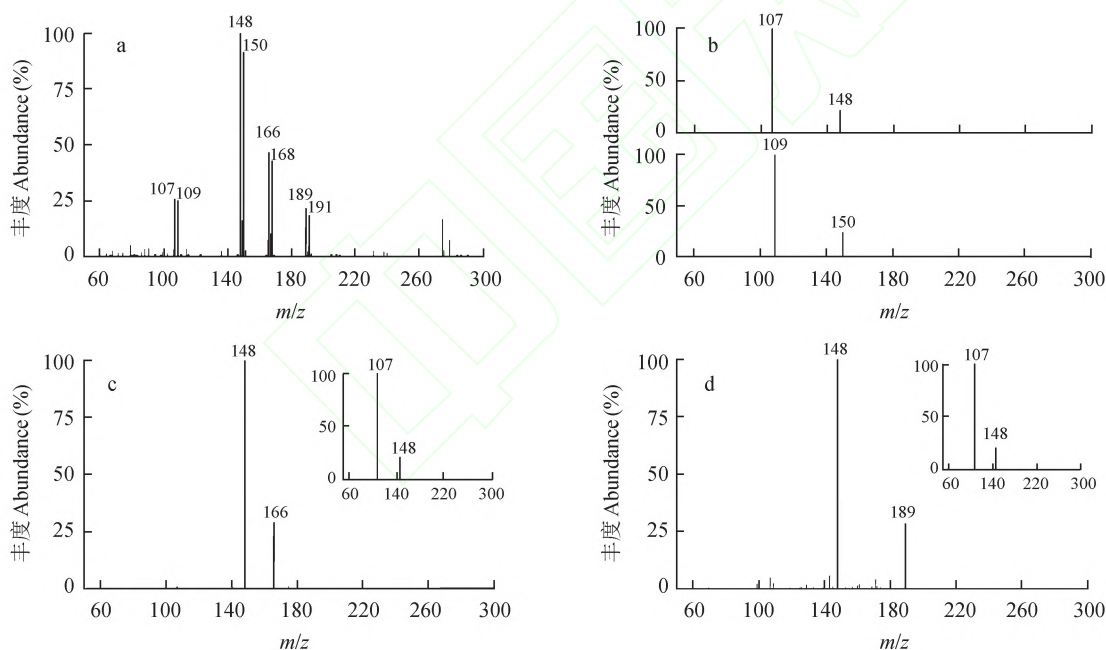


图 2 乙腈标准品的 EESI-MSⁿ 质谱图

Fig. 2 EESI-MSⁿ spectra of standard acetonitrile solution

(a) EESI-MS 一级质谱图; (b) m/z 148 及 m/z 150 的二级质谱图; (c) m/z 166 的二级、三级(插图)质谱图; (d) m/z 189 的二级、三级(插图)质谱图。

(a) EESI-MS spectrum; (b) MS² spectra of m/z 148 and m/z 150; (c) MS², MS³ (inset) spectra of m/z 166; (d) MS², MS³ (inset) spectra of m/z 189.

3.2 呼出气体的 EESI 质谱图

采用与检测乙腈标准品相同的实验方法, 对健康志愿者呼出气体进行 EESI-MS 扫描。志愿者呼出气体一级指纹谱图(图 3a)中, 获得了离子峰 m/z 107 (Ag^+)、 m/z 109 (Ag^+ 同位素); 还有目标信号 m/z 148 和 150, 通过二级质谱鉴定, 可确认是 $[\text{}^{107}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ 和 $[\text{}^{109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ (图 3b)。

一级谱图中获得的较高信号峰 m/z 139, 157 和 m/z 141, 159。进行二、三级质谱分析, 鉴定出这些离子分别为 $[\text{}^{107}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$, $[\text{}^{107}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}]^+$ (图 3c, 3d 及其插图) 和 $[\text{}^{109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$,

[$^{109}\text{Ag}+\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}$] $^+$ (银同位素加合峰)。相比于乙腈标准品谱图,实际呼出气体谱图中 Ag^+ 与 CH_3OH 结合为主,而 Ag^+ 与 CH_3CN 的加合峰丰度仅为 25%,这可能是由于呼出气体中乙腈的含量较低。

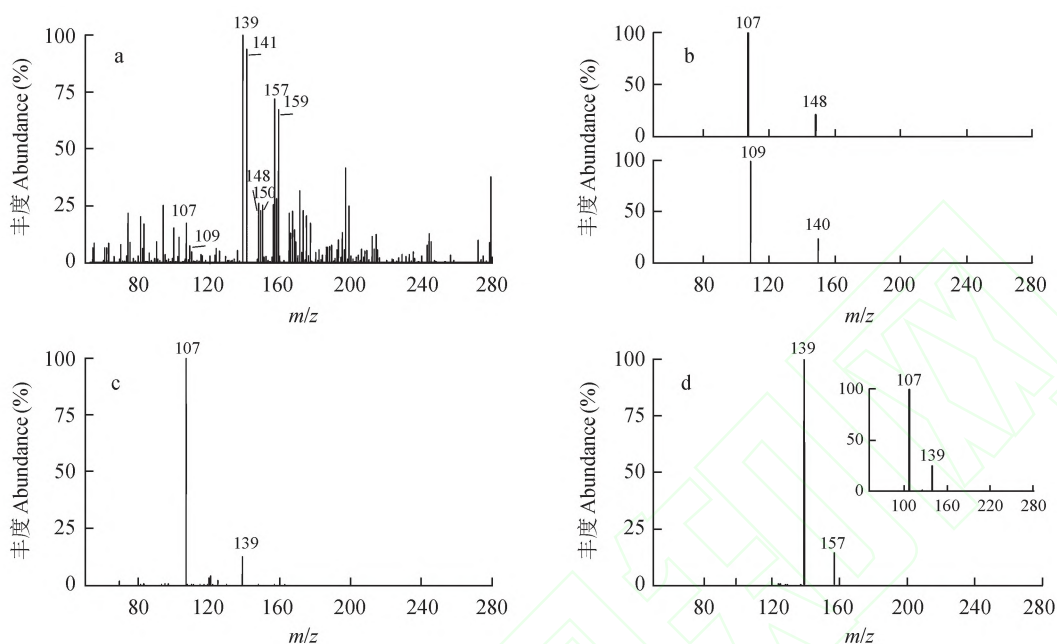


图3 呼出气体中乙腈的 EESI-MS n 质谱图

Fig. 3 EESI-MS n spectra of acetonitrile in human exhaled breath

(a) EESI-MS 一级质谱图; (b) m/z 148 及 m/z 150 的二级质谱图; (c) m/z 139 的二级质谱图; (d) m/z 157 的二级、三级(插图)质谱图。

(a) EESI-MS spectrum; (b) MS 2 spectra of m/z 148 and m/z 150; (c) MS 2 spectrum of m/z 139; (d) MS 2 , MS 3 (inset) spectra of m/z 157.

3.3 呼出气体中乙腈的半定量分析

目前,呼出气体定量分析的准确度主要受制于没有合适的呼出气体标准样品。本研究采用 2.2 节的实验方法,通过理论计算,将液相中乙腈浓度换算成气相中乙腈浓度,为气态样品的定量分析提供了一个有效的思路。虽然所使用的乙腈标准样品与呼吸气体真实样品不完全一致,但它仍可为呼出气体中乙腈检测提供有效的定量信息。

3.3.1 线性范围、检出限和精密度 实验配制系列梯度浓度 50 ~ 2500 nL/L 的乙腈标准溶液,按上述方法进行实验。为排除假阳性信号,选择 m/z 148 ($[\text{Ag}^+\text{CH}_3\text{CN}]^+$) 的二级特征碎片离子 m/z 107 (Ag^+) 进行定量分析,同时扣除相应的背景。每个浓度的标准样品测定 7 次,以其净响应信号强度平均值与对应的气相乙腈浓度绘制标准对数曲线(图 4)。实验表明,气相乙腈浓度在 76.4 ~ 1910 pL/L 范围内,离子强度与浓度具有较好的线性关系。线性回归方程为 $\log I = 0.92002 \log c_g + 0.630$, 相关系数 $R = 0.999$ 。

对 50 nL/L 标准样品平行测定 10 次,精密度(RSD)为 5.0%,气相乙腈的检出限(LOD, $S/N = 3$, 根据 $\text{LOD} = 3\sigma/S$ 进行计算)为 5.71 pL/L。可见,本方法灵敏度高、检出限低、精密度好,适合于痕量乙腈的半定量检测。

3.3.2 呼出气体中乙腈含量分析 两名无吸烟习惯的健康志愿者,年龄分别为 25 和 26 岁。志愿者早

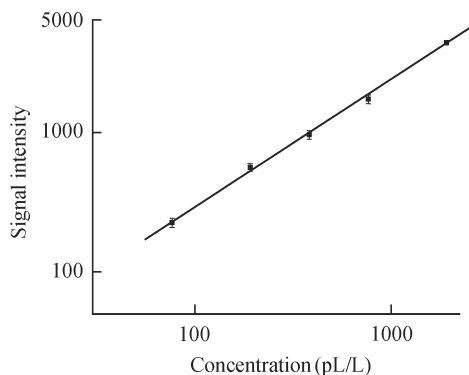


图4 乙腈的校准曲线

Fig. 4 Calibration curve of acetonitrile standard solution

晨(约 8:30 am)空腹状态下的呼出气体通过特氟龙管引入 EESI 源,呼出气体流量约为 0.8 L/min,得到二级特征信号 m/z 107 的净响应信号强度。每名志愿者呼气 10 次,每次持续 10~15 s。通过校准曲线,由线性回归方程计算得呼出气体中乙腈含量。取 10 次测量平均值,所检测两名志愿者呼出气体中乙腈含量分别为 134.49 和 104.40 pL/L, RSD 为 6.3% 和 7.2%。实验表明,本方法分析速度快、特异性强、精密度好,适宜于人体呼出气体中痕量乙腈的检测。

本方法还可以方便地实时监测人体呼出气体中乙腈含量的变化。以 6 名健康志愿者午餐前后呼出气体中乙腈含量的变化为例。实验表明,当人体摄入一定量食物后,呼出气体中乙腈含量迅速升高,大约 30 min 达到最高值,约为餐前的 2~4 倍;随后乙腈含量逐渐降低,约在午餐后 2 h,回到餐前水平(图 5)。原因可能是人体摄入食物后,生理代谢速度及血液循环过程加快,经由血液运送到肺部并通过气体交换进入肺泡的乙腈分子增多,使得随呼出气体排出的乙腈含量有所升高。这个规律与通常人体的生理常识基本一致。因而,利用本方法同样可以获得与呼吸气体有关的人体生理病理信息。

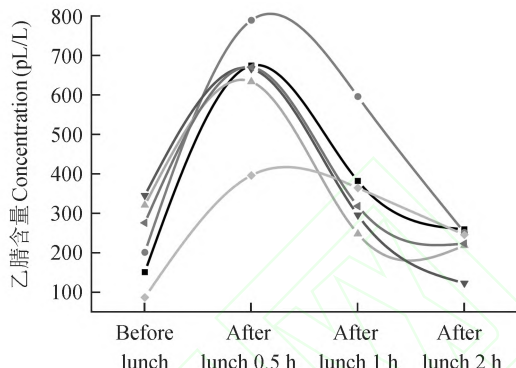


图 5 午餐前后 6 名志愿者呼出气体中乙腈含量变化
Fig. 5 Change of acetonitrile concentration in breath before and after lunch for six volunteers

4 结 论

以 AgNO_3 /甲醇溶液为电喷雾溶剂,无需任何样品预处理,建立 EESI-MSⁿ法直接对呼出气体中乙腈进行定性、半定量分析。通过对操作参数中的电喷雾溶剂配比、溶剂流速、喷雾电压、喷雾气(N_2)压力、离子传输管温度等进行优化,能有效获取乙腈的信息。本方法灵敏度高,分析速度快,特异性强,实现了对呼出气体中乙腈的直接实时在线检测,为呼出气体中其它标志物分子检测提供了新思路,在临床医学、代谢组学等领域具有潜在的应用价值和重要的借鉴意义。

References

- Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Schwarz K, Ligor M, Ligor T, Filipiak W, Denz H, Fiegl M. *BMC Cancer*, **2009**, 9(1): 348
- Song G, Qin T, Liu H, Xu G B, Pan Y Y, Xiong F X, Gu K S, Sun G P, Chen Z D. *Lung Cancer*, **2010**, 67(2): 227-231
- Michael M, Cullinane C, Hatzimihalis A, O'Kane C, Milner A, Booth R, Schlicht S, Clarke S J, Francis P. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2012**, 69: 125-135
- Schubert R, Schwoebel H, Mau-Moeller A, Behrens M, Fuchs P, Sklorz M, Schubert J K, Bruhn S, Miekisch W. *Metabolomics*, **2012**: 1-12
- Armuzzi A, Candelli M, Zocco M A, Andreoli A, De Lorenzo A, Nista E C, Miele L, Cremonini F, Cazzato I A, Grieco A. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2002**, 16(12): 1977-1996
- Hansel A, Jordan A, Warneke C, Holzinger R, Lindinger W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12(13): 871-875
- Kushch I, Schwarz K, Schwentner L, Baumann B, Dzien A, Schmid A, Unterkofler K, Gastl G, Spanel P, Smith D. *J. Breath Res.*, **2008**, 2: 026002
- Prazeller P, Karl T, Jordan A, Holzinger R, Hansel A, Lindinger W. *Int. J. Mass Spectrom.*, **1998**, 178(3): L1-L4
- Beck O, Leine K, Palmskog G, Franck J. *J. Anal. Toxicol.*, **2010**, 34(5): 233-237
- Giacomuzzi S M, Riemer Y, Pavlic M, Schmid A, Hinterhuber H, Amann A. *Subst. Use Misuse*, **2009**, 44(2): 301-304
- Pinggera G M, Lirk P, Bodogri F, Herwig R, Steckel-Berger G, Bartsch G, Rieder J. *BJU Int.*, **2005**, 95(3): 306-309
- HUANG Jing-Fang, XU Yun. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2003**, 23(2): 131-133
黄京芳, 徐 云. *药物分析杂志*, **2003**, 23(2): 131-133

- 13 YI Jun-Bo, MAI Zhi-Gang, QIU Gang-Feng, LI Ling-Yun, ZHOU Zhao-Ping, LIN Feng. *Chin. J. Pharm. Anal.*, **2009**, 29(3): 501–503
易俊波, 买制刚, 邱岗峰, 李凌云, 周兆平, 林枫. 药物分析杂志, **2009**, 29(3): 501–503
- 14 Buszewski B, Ulanowska A, Ligor T, Denderz N, Amann A. *Biomed. Chromatogr.*, **2009**, 23(5): 551–556
- 15 Ligor T, Ligor M, Amann A, Ager C, Bachler M, Dzien A, Buszewski B. *J. Breath Res.*, **2008**, 2: 046006
- 16 Abbott S M, Elder J B, Španel P, Smith D. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 228(2): 655–665
- 17 Jordan A, Hansel A, Holzinger R, Lindinger W. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1995**, 148(1-2): L1–L3
- 18 Lindinger W, Hansel A, Jordan A. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1998**, 173: 191–241
- 19 QU Hong-Bo, LIANG Feng, XU Ming-Kun, CAI Ting-Dong, ZHANG Shu-Dong, KONG Xiang-He, LI Hai-Yang. *Chin. J. Spectrosc. Lab.*, **2006**, 23(3): 554–557
渠洪波, 梁峰, 许明坤, 蔡庭栋, 张树东, 孔祥和, 李海洋. 光谱实验室, **2006**, 23(3): 554–557
- 20 Purkhart R, Hillmann A, Graupner R, Becher G. *Int. J. Ion Mobil. Spec.*, **2012**, 15: 63–68
- 21 Chen H W, Wortmann A, Zhang W H, Zenobi R. *Angew. Chem.*, **2007**, 119(4): 586–589
- 22 Ding J H, Yang S P, Liang D P, Chen H W, Wu Z Z, Zhang L L, Ren Y L. *Analyst*, **2009**, 134(10): 2040–2050
- 23 CHEN Huan-Wen, HU Bin, ZHANG Xie. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(8): 1069–1088
陈焕文, 胡斌, 张燮. 分析化学, **2010**, 38(8): 1069–1088
- 24 Benkelberg H J, Hamm S, Warneck P. *J. Atmos. Chem.*, **1995**, 20: 17–34
- 25 HU Chang-Feng, OU-YANG Li, PENG Jia-Rou. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2001**, 29(3): 280–282
胡长风, 欧阳荔, 彭嘉柔. 分析化学, **2001**, 29(3): 280–28
- 26 Ding J H, Gu H W, Yang S P, Li M, Li J Q, Chen H W. *Anal. Chem.*, **2009**, 81: 8632–8638

Direct Detection of Acetonitrile in Human Breath by Extractive Electro-spray Ionization Mass Spectrometry

ZHANG Yan¹, PAN Su-Su¹, ZHU Zhi-Qiang¹, ZHANG Xing-Lei¹, XU Gao-Si²,
WEI Yi-Ping², CHEN Huan-Wen¹, DING Jian-Hua^{*1}

¹(Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation,
East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

²(The Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract Breath analysis by virtue of its potential medical research value, and as a non-invasive sample, simple sampling and continuous available is of interest for modern clinical diagnosis and metabonomics. The concentration levels of acetonitrile, an important biomarker in human exhaled gas, are correlated with human health. Herein we constructed a novel platform of extractive electro-spray ionization-mass spectrometry (EESI-MS) for direct, rapid detection of acetonitrile in human breath without any sample pretreatment. Under the optimized working conditions, the quantitative information of acetonitrile in human breath was acquired effectively. For acetonitrile, a limit of detection was found to be 5.71 pL/L; the linear range was from 76.4 pL/L to 1910 pL/L. The concentration of acetonitrile in the exhaled breath of two healthy volunteers was in vivo determined to be 134.49 and 104.40 pL/L, respectively, the relative standard deviations were 6.3% and 7.2%. The results show that EESI-Ion Trap MS is a powerful analytical platform to provide high sensitivity, high precision, rapid analysis and high specificity for semi-quantitative analysis of acetonitrile in human breath, and for detection of other bio-molecules in exhaled breath potentially.

Keywords Extractive electro-spray ionization-mass spectrometry; Acetonitrile; Exhaled breath

(Received 29 October 2012; accepted 17 January 2013)