

人体泪液中尼古丁的 Schirmer 试纸采集及原位质谱检测

狄丹丹¹, 王昭涵², 胡斌¹

(1. 暨南大学质谱仪器与大气环境研究所, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632)

摘要:日常长时间暴露在烟草烟雾环境对人眼健康具有重要影响。本研究采用医用 Schirmer 试纸直接无创采集暴露在烟草烟雾环境下微量的人体泪液, 通过施加电压与溶剂直接发生纸喷雾电离, 并采用原位质谱检测。实验考察了尼古丁检测的灵敏度、精密度、回收率、定量检测线性范围等分析性能, 以及不同暴露时间下泪液中尼古丁含量的变化。结果表明, Schirmer 试纸喷雾电离质谱具有安全无创、操作简便、灵敏度高、特异性好、泪液消耗量低至 1.0 μL 等优点, 为人眼的环境暴露与健康分析提供了有效方法。

关键词:泪液; Schirmer 试纸; 原位质谱; 纸喷雾质谱; 尼古丁

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2021)04-0480-07

doi: 10.7538/zpxb.2021.0025

Schirmer Paper Sampling and Ambient Mass Spectrometry Determination of Nicotine from Human Tears

DI Dan-dan¹, WANG Zhao-han², HU Bin¹

(1. *Institute of Mass Spectrometry and Atmospheric Environment, Jinan University, Guangzhou 510632, China*; 2. *College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China*)

Abstract: Tobacco smoke contains a large number of harmful substances and has been widely proved to be able to induce a variety of human diseases. Human eyes are exposed to ambient air for a long time in daily life and are susceptible to air pollutants such as tobacco smoke in the air. Therefore, direct monitoring of characteristic components of tobacco smoke in human tears is expected to efficiently assess the exposure level of tobacco smoke to human eyes. Due to human tears at the microliter level, it's a challenge to analyse tears by conventional sample collection and chemical analysis methods. Mass spectrometry (MS) has the unique advantages of high sensitivity, specificity and speed, especially, the development of ambient MS with solid substrates has greatly facilitated direct sample analysis with little or no sample pretreatment. Schirmer paper strip is clinically used for sampling of human tears, which is safe, non-invasive, and can be used

for measuring the volume of tears. In this study, a small Schirmer paper strip was further prepared for noninvasive microsampling of human tears which exposed to tobacco smoke, and high voltage and organic solvent were applied onto Schirmer paper to directly generate paper spray ionization for ambient MS analysis. The good analytical performances, including sensitivity (LOD: $0.1 \mu\text{g/L}$, $S/N \geq 3$; LOQ: $1.0 \mu\text{g/L}$, $S/N \geq 10$), precision (RSD: 4.89%-7.61%, $n=5$, with internal standard), recovery (98%-102.1%, $n=5$), and linear range ($0.5\text{-}50 \mu\text{g/L}$, $R^2 = 0.9918$) were achieved. Monitoring nicotine in human tears under different exposure time was also investigated, showing that the concentration of nicotine would increase with increasing the exposure time ranging from 0 to 8 min. The nicotine could reach to $45 \mu\text{g/L}$ after burning a cigarette (about 8 min). The retention time of nicotine in human tears was found to about 20 min (less than 5%), and the half-life time was about 4 min. Overall, the results showed that Schirmer paper spray mass spectrometry can be used for qualitative and quantitative detection of trace environmental exposures such as nicotine in human eyes with many advantages, including safe, noninvasive, easy-to-operation, low-consumption as low as $1.0 \mu\text{L}$, and thus has potential for many applications in environmental exposure and human health.

Key words: human tears; Schirmer paper; ambient mass spectrometry; paper spray mass spectrometry; nicotine

烟草燃烧的烟雾中含有大量有害物质,吸烟被证实能够诱导多种人体疾病的发生^[1-3],空气中的二手烟雾会对人体的呼吸系统、心血管系统、消化系统和生殖系统的健康产生影响^[4-5]。人的眼睛每天长时间暴露于空气环境中,在有烟草烟雾时,人眼不仅会感觉不适^[6],还可能诱导产生多种眼部疾病并造成视力下降^[7-8]。人体泪液中含有大量的水、蛋白质、脂质、细胞因子以及代谢物,这些成分除了保持眼球润滑和免疫的生理功能,还能反映人体的生理病理状态及环境暴露情况^[9]。因此,通过对泪液中烟草特征成分的直接分析检测,可以快速评估烟草烟雾在人眼的暴露水平。然而,由于人体泪液分泌量在微升级,常规的样品采集与化学分析方法面临巨大挑战^[10],亟需无创、微量、高灵敏度的分析方法。

质谱(MS)技术具有灵敏度高、特异性好和信号响应快等优点,尤其是原位质谱(ambient mass spectrometry)技术的发展,在无需或仅需简单样品预处理的条件下,可以实现包括人体体液在内的复杂样品的原位分析^[11-12]。以纸、木签、金属针等固相基底材料为电喷雾电离探针的原位质谱技术具有操作简便、样

本消耗量少、分析速度快、灵敏度高等特点^[13-15],极大地推动了临床人体体液分析技术的发展。医用 Schirmer 试纸用于临床检验干眼症,具有安全、无创、吸水性好等特点,可以快速收集和测定微量体积的泪液^[16]。在前期工作中,本课题组结合 Schirmer 试纸的无创采集与纸喷雾质谱技术的特点,发展了基于 Schirmer 试纸的纸喷雾质谱(PSMS)技术,探索了泪液成分的无创采集与质谱分析^[17]。

本工作将进一步微小化 Schirmer 试纸,实现人体在烟草烟雾环境暴露下微量泪液的精准无创收集,并采用纸喷雾质谱方法测定烟雾的标志物尼古丁。考察 Schirmer 试纸喷雾质谱检测尼古丁的灵敏度、精密度、回收率、定量检测线性范围等分析性能,以及人体泪液中尼古丁含量与在烟草烟雾环境暴露时间的关系和尼古丁的滞留动力学。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Q Exactive 四极杆-静电轨道高分辨质谱仪;美国赛默飞世尔科技公司产品,配有纳升电喷雾电离源(nano-ESI)及 Xcalibur3.0 数据处

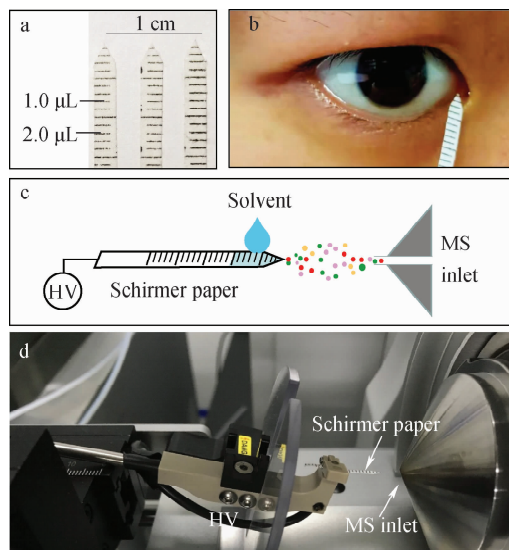
理系统,在正离子模式下采集质谱数据。

1.2 主要材料与试剂

尼古丁(NC)及其内标物尼古丁-d4(NC-d4)标准溶液:美国 Cerilliant 公司产品;医用 Schirmer 试纸:辽宁梅兹林药业有限公司产品;香烟(盒标烟气烟碱量(即尼古丁)为 1.2 mg/支):广东中烟工业有限责任公司产品;甲醇(HPLC级):北京百灵威科技公司产品。

1.3 采样方法

将购买的医用 Schirmer 试纸(宽度 5 mm,长度 40 mm)剪成带有尖端的细纸条(宽度 2.5 mm,长度 30 mm,尖端尺寸 <0.1 mm),示于图 1a;将纸条尖端轻轻触碰眼角吸取泪液进行无创采样,示于图 1b,根据纸条湿润长度测定收集的泪液体积。将健康志愿者流出的泪液收集到 1.5 mL 离心管中用于制备加标样品。本实验受试者在签署了知情同意书后参加关于烟草烟雾暴露的研究和泪液采集及分析。



注:a. 细化 Schirmer 纸条;b. 人体泪液采集;
c. Schirmer 纸喷雾质谱示意图;
d. Schirmer 纸喷雾质谱实物装置

图 1 Schirmer 纸喷雾电离质谱测定泪液

Fig. 1 Schirmer PSMS analysis of human tears

1.4 实验条件

1.4.1 电离条件 将收集的纸条样品静置于干燥后置于 nanoESI 装置,试纸尖端与质谱仪入口间的距离约 4.0 mm,采用优化的试剂(1.0 μ L 甲醇)和高压电(3 kV)直接产生电喷雾电

离后通过质谱测定,示于图 1c,实物装置示于图 1d。

1.4.2 质谱分析 质谱离子传输管毛细管温度 150 $^{\circ}$ C。使用全扫描(Full MS)和平行反应监测(PRM)模式,分辨率分别为 70 000 和 17 500,至少记录 30 s,扫描速率 4.8 次/秒,质量扫描范围 m/z 100~1 500;对于 MS/MS 实验,隔离窗口设置为 0.4 u。测定样品的质谱图以空白 Schirmer 试纸在纯甲醇条件下为背景信号进行扣减。

1.5 标准溶液配制与标准曲线绘制

使用泪液配制浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0、50.0 μ g/L 尼古丁工作液,采用喷雾试剂甲醇配制内标物尼古丁-d4(浓度为 10.0 μ g/L)。测定并计算尼古丁与尼古丁-d4 的信号比值,每个浓度测定 3 次,取平均值,根据信号比值与尼古丁浓度的关系绘制标准曲线。

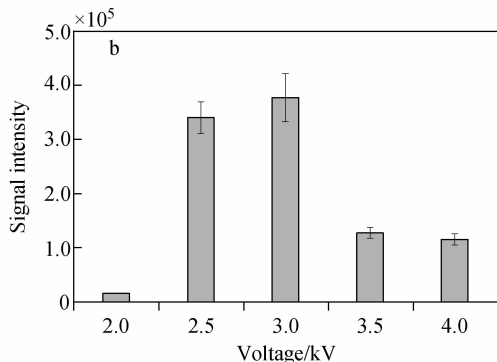
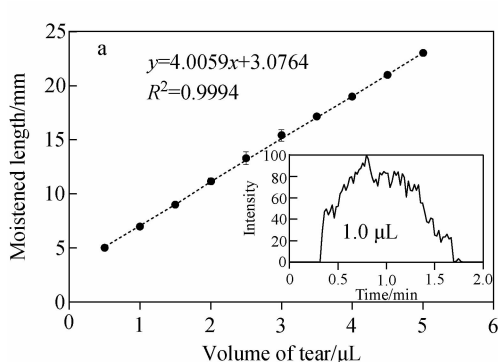
1.6 分析性能测试

在泪液中添加尼古丁标准溶液,配制尼古丁浓度分别为 3.0、15.0、30.0 μ g/L 的加标样品,采用加内标的甲醇作为喷雾试剂,测定尼古丁与尼古丁-d4 的信号比,每个浓度重复测定 5 次,计算重现性,并与工作曲线比对,计算回收率。逐级稀释尼古丁加标的泪液,测得该方法的检出限($S/N \geq 3$)和定量限($S/N \geq 10$)。

2 结果与讨论

2.1 泪液采集及电离条件考察

采用修剪好的 Schirmer 试纸测定 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 μ L 不同体积的泪液在纸条上润湿的长度,观测到泪液体积与湿润长度具有线性关系,可用于泪液体积的定量分析,示于图 2a。同时发现,滴加 1.0 μ L 泪液即可获得细化后的 Schirmer 试纸超过 5.0 mm 的润湿长度,具有较大的扩散度,滴加 1.0 μ L 甲醇即可完全满足喷雾电离实验的要求,喷雾持续时间超过 1 min,示于图 2a 插图。此外,考察了 1.0 μ L 含有 1 ng 尼古丁的泪液在 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 kV 不同喷雾电压下的信号响应,发现喷雾电压在 3.0 kV 时,质子化尼古丁 $[M+H]^+$ m/z 163.122 7 的信号响应最强,示于图 2b。



注:a. 泪量与试纸湿润长度的关系(插图为 1.0 μL 泪液的信号持续时间); b. 电离电压的优化

图 2 实验条件的优化

Fig. 2 Optimization of experimental parameters

2.2 泪液中尼古丁的检测

首先,使用 Schirmer 试纸喷雾电离质谱分析 0.1 $\mu\text{g/L}$ 尼古丁与尼古丁-d4 的甲醇溶液,获得质子化尼古丁的特征信号峰(尼古丁 m/z 163.122 7, 尼古丁-d4 m/z 167.147 5),示于图 3a。对尼古丁与尼古丁-d4 离子进行二级质谱扫描,其主要的碎片离子分别示于图 3b、3c。然后,使用修剪后的 Schirmer 试纸分别对暴露于正常环境与烟草烟雾环境下的志愿者眼泪进行无创采样,对采集泪液的试纸条进行直接质谱分析,同时进行一级质谱扫描和 m/z 163.116 9 离子的二级质谱扫描。在正常大气环境下,人体泪液中未检测到尼古丁离子的特征信号及其碎片离子,示于图 4a;在暴露于烟雾的泪液中检测到尼古丁的特征离子 m/z 163.122 7,并且其碎片离子与尼古丁标准品一致,示于图 4b。

实验还考察了尼古丁的定量检测性能,示于图 4c。尼古丁在 0.5~50.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内呈良好的线性关系($R^2 = 0.991 8$),测得泪液中的尼古丁检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别为 0.1 $\mu\text{g/L}$ ($S/N \geq 3$)和 1.0 $\mu\text{g/L}$ ($S/N \geq 10$)。

为进一步评估方法的稳定性,配制低、中、高 3 个浓度水平的尼古丁加标泪液,分别为 3.0、15.0、30.0 $\mu\text{g/L}$,按照上述优化方法分析测定,每个浓度平行操作 5 次,计算回收率和稳定性,结果列于表 1。可见,使用 Schirmer 纸喷雾电离质谱分析检测泪液中的尼古丁具有较好的精确度和稳定性。

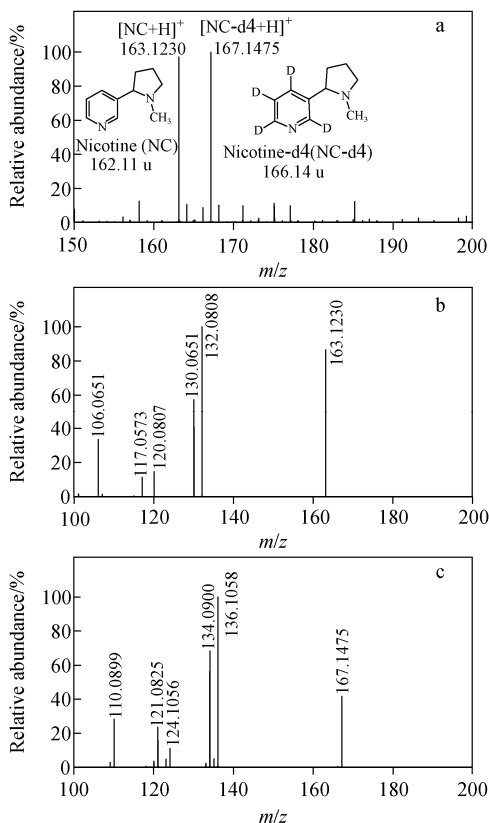
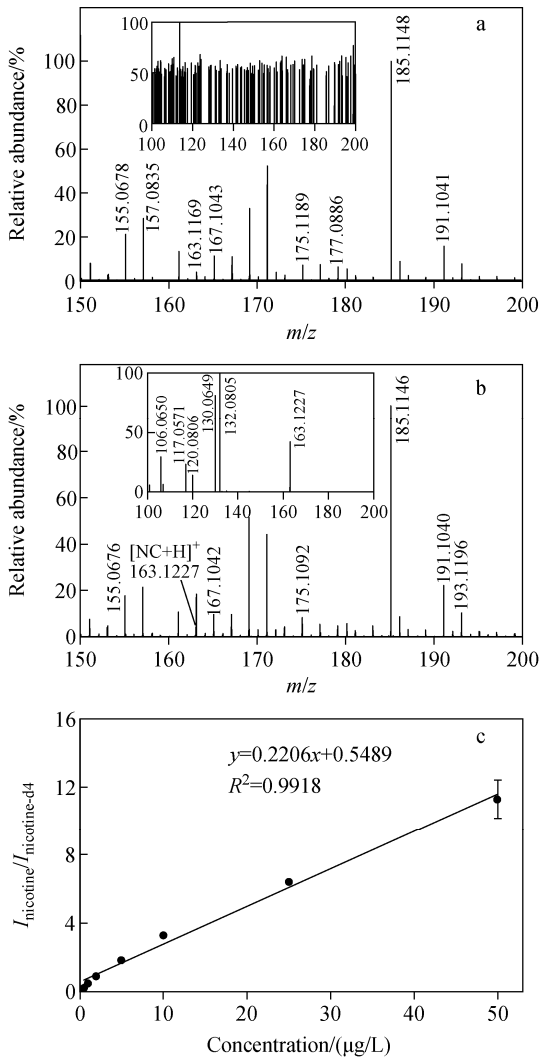


图 3 尼古丁与尼古丁-d4 的一级质谱图(a), 尼古丁(b)和尼古丁-d4(c)的二级质谱图

Fig. 3 MS spectrum of nicotine and nicotine-d4 (a), MS/MS spectra of nicotine (b) and nicotine-d4 (c)

2.3 烟草烟雾环境暴露泪液分析

本实验考察了 4 名成年不吸烟志愿者(3 名女性和 1 名男性,年龄均在 22~25 岁之间)的泪液在烟雾环境下的暴露情况。在无风静态环境下,距离志愿者眼睛约 40 cm 处点燃一支香



注: a. 未暴露于烟草烟雾环境的泪液质谱图
(插图为 m/z 163.116 9 离子的二级质谱图);

b. 暴露于烟草烟雾环境的泪液质谱图
(插图为 m/z 163.122 7 离子的二级质谱图);

c. 尼古丁信号比与浓度的关系图

图 4 泪液中尼古丁的质谱测定

Fig. 4 Schirmer PSMS detection
of nicotine in human tears

烟,人眼暴露在烟草烟雾环境中 0.5、1.0、3.0、5.0、8.0 min 后,立即采用细化的 Schirmer 试纸进行无创采样,滴加 $1.0 \mu\text{L}$ $10.0 \mu\text{g/L}$ 尼古丁-d4 的甲醇溶液进行纸喷雾电离质谱检测,并根据泪液采集量 ($1.0 \mu\text{L}$) 及标准曲线计算检测的尼古丁浓度,绘制暴露时间与尼古丁浓度的条状图,示于图 5a。人体泪液中尼古丁的浓度随暴露时间的增加而增加,一支烟燃尽(约 8.0 min)时,暴露在人泪液中的尼古丁浓度达到 $45.0 \mu\text{g/L}$ 左右,暴露于眼睛的烟草烟雾总烟碱的 $3.75 \times 10^{-6} \%$ (根据盒标烟气烟碱含量 1.2 mg/支),表明烟草烟雾中尼古丁在人眼中有较高的环境暴露水平。

本实验进一步考察了人眼中尼古丁的滞留动力学,在烟雾中暴露 8 min 后,即一支烟燃尽后,在暴露后的 0、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0、12.0、15.0、20.0 min 监测泪液中尼古丁的含量变化,示于图 5b。结果表明,泪液中尼古丁的浓度随时间增加而迅速下降,滞留动力学呈指数衰减曲线下,滞留半衰期 $t_{1/2}$ 约为 4 min; 在 20.0 min 后,泪液中的尼古丁将代谢完全 ($<5.0 \%$),表明泪液中尼古丁已经从眼部转移至其他部位。

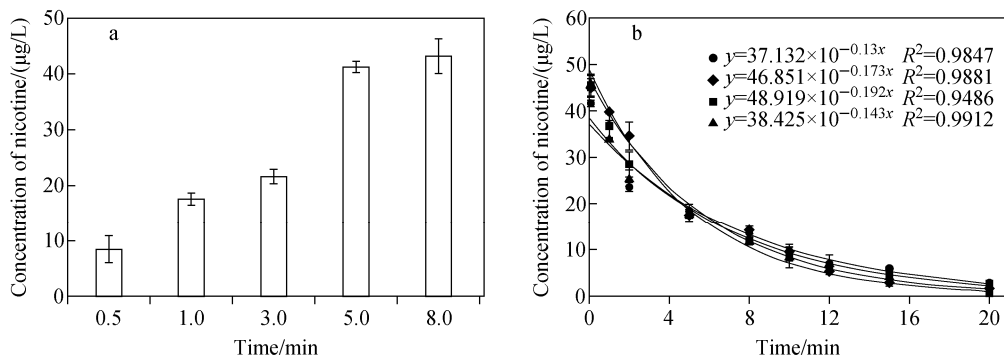
3 结论

本实验采用 Schirmer 试纸采集微量人体泪液,并结合纸喷雾质谱分析,考察了该方法的分析性能,检测了人眼暴露在烟草烟雾环境不同时间下泪液中尼古丁的浓度变化,并探索了泪液中尼古丁的滞留动力学。结果表明,该方法活体无创、灵敏、快速,有望结合小型质谱仪器用于现场分析^[18],为眼部疾病诊断与环境健康研究提供了有效的方法。

表 1 尼古丁的回收率与相对标准偏差 ($n=5$)

Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the nicotine ($n=5$)

| 加标浓度 Spiked concentration/ $(\mu\text{g/L})$ | 测定值 Measured concentration/ $(\mu\text{g/L})$ | 相对标准偏差 RSD/ $\%$ | 回收率 Recovery/ $\%$ |
|---|--|---------------------|-----------------------|
| 3.0 | 2.94 ± 0.22 | 7.48 | 98.00 |
| 15.0 | 14.71 ± 0.75 | 4.89 | 98.07 |
| 30.0 | 30.63 ± 2.33 | 7.61 | 102.10 |



注:a. 烟草烟雾环境下暴露时间;b. 暴露 8 min 后泪液中尼古丁的滞留动力学

图 5 暴露时间与滞留时间对泪液中尼古丁的影响

Fig. 5 Effects of exposure time and storage time on nicotine in tears

参考文献:

- [1] HECHT S S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1999, 91(14): 1 194-1 210.
- [2] PFEIFER G P, DENISSENKO M F, OLIVIER M, TRETYAKOVA N, HECHT S S, HAINAUT P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers[J]. Oncogene, 2002, 21(48): 7 435-7 451.
- [3] HECHT S S, HOFFMANN D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke[J]. Carcinogenesis, 1988, 9(6): 875-884.
- [4] CHAN-YEUNG M, DIMICH-WARD H. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke[J]. Respiriology, 2003, 8(2): 131-139.
- [5] VALENTE P, FORASTIERE F, BACOSI A, CATTANI G, DI CARLO S, FERRI M, FIGATALAMANCA I, MARCONI A, PAOLETTI L, PERUCCI C, ZUCCARO P. Exposure to fine and ultrafine particles from secondhand smoke in public places before and after the smoking ban, Italy 2005[J]. Tobacco Control, 2007, 16(5): 312-317.
- [6] WIESLANDER G, LINDGREN T, NORBACK D, VENGE P. Change in the ocular and nasal signs and symptoms of aircrews in relation to the ban on smoking an intercontinental[J]. Scandinavian Journal of Work Environment & Health, 2000, 26(6): 514-522.
- [7] LOIS N, ABDELKADER E, REGLITZ K, GARDEN C, AYRES J G. Environmental tobacco smoke exposure and eye disease[J]. British Journal of Ophthalmology, 2008, 92(10): 1 304-1 310.
- [8] ASFAR T, LAM B L, LEE D J. Smoking causes blindness: time for eye care professionals to join the fight against tobacco[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015, 56(2): 1 120-1 121.
- [9] ZHOU L, BEUERMAN R W. Tear analysis in ocular surface diseases[J]. Progress in Retinal and Eye Research, 2012, 31(6): 527-550.
- [10] LAM S M, TONG L, DUAN X, PETZNICK A, WENK M R, SHUI G. Extensive characterization of human tear fluid collected using different techniques unravels the presence of novel lipid amphiphiles[J]. Journal of Lipid Research, 2014, 55(2): 289-298.
- [11] 李宝强, 张众垚, 孔景临, 张琳, 郭成海, 李翠萍. 敞开式离子化质谱技术研究进展[J]. 质谱学报, 2020, 41(3): 221-235.
- [12] LI Baoqiang, ZHANG Zhongyao, KONG Jinglin, ZHANG Lin, GUO Chenghai, LI Cuiping. Research progress of ambient ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2020, 41(3): 221-235(in Chinese).
- [12] 张兴磊, 张华, 王新晨, 黄科科, 王丹, 陈焕文. 直接离子化装置研究新进展[J]. 分析化学, 2018, 46(11): 1 703-1 713.
- ZHANG Xinglei, ZHANG Hua, WANG Xinchen, HUANG Keke, WANG Dan, CHEN Huanwen. Advances in ambient ionization for

- mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(11): 1 703-1 713(in Chinese).
- [13] HU B, SO P K, CHEN H, YAO Z P. Electrospray ionization using wooden tips[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(21): 8 201-8 207.
- [14] 胡斌,姚钟平. 固相基底电喷雾电离质谱的原理及应用[J]. 中国科学:化学,2017,47(12):1 365-1 378.
HU Bin, YAO Zhongping. Principles and applications of solid-substrate electrospray ionization mass spectrometry[J]. Scientia Sinica Chimica, 2017, 47(12): 1 365-1 378(in Chinese).
- [15] WANG H, LIU J, COOKS R G, OUYANG Z. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2010, 49(5): 877-880.
- [16] SUE S. Schirmer's test[J]. Community Eye Health, 2011, 24(76): 45.
- [17] YAO Y N, DI D, YUAN Z C, WU L, HU B. Schirmer paper noninvasive microsampling for direct mass spectrometry analysis of human tears [J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(9): 6 207-6 212.
- [18] 郭项雨,黄雪梅,翟俊峰,白桦,李晓旭,马潇潇,马强. 原位电离小型便携式质谱的研究进展[J]. 分析化学,2019,47(3):335-346.
GUO Xiangyu, HUANG Xuemei, ZHAI Junfeng, BAI Hua, LI Xiaoxu, MA Xiaoxiao, MA Qiang. Research advances in ambient ionization and miniature mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(3): 335-346(in Chinese).

(收稿日期:2021-03-04;修回日期:2021-03-26)