

DISS. ETH NO. 30137

Improving On-Line Breath Analysis with Ambient Mass Spectrometry

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

CEDRIC DARIO WÜTHRICH

MSc ETH Chemistry, ETH Zurich

born on 05.10.1995

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner

Prof. Dr. Claudia Mohr, co-examiner

Prof. Dr. Pablo Sinues, co-examiner

2024

Abstract

The analysis of molecules in exhaled breath is a non-invasive way for potentially gauging the health status of a human. However, there are only a few FDA-approved diagnostic breath tests, which mostly rely on the detection of $^{13}\text{CO}_2$ after ingestion of labeled substrates. There has been no test specifically detecting endogenous molecules for diagnostic purposes. Breath analysis therefore requires better methods and workflows. The ambient ionization technique secondary electrospray ionization (SESI), coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS) is a sensitive technique for on-line breath analysis. This technique has the potential to serve as a discovery tool for exhaled breath biomarkers. To achieve this potential, this thesis addresses some of the challenges connected to SESI-HRMS-based breath analysis. These challenges involve confounding biological variables, as well as annotation and quantification of biomarker candidates.

In this thesis, the effect of a nutritional intervention on the composition of exhaled breath is described. Eleven subjects drank a shake consisting of sugar, fat, and protein. Their exhalations were monitored over a period of six hours. The relationship of the detected features with the intervention was established through comparison with fasting. Clustering of these features' time traces revealed various responses, with some immediate and some more delayed responses. *In silico* fragment matching and pathway analysis revealed

the connection of certain features with the metabolism of linoleate, and butanoate, as well as connections to the *Krebs* cycle and gut microbiome activity. The results presented provide the basis to estimate the effect of food intake on exhaled breath.

Further, the use of the alternative electrospray dopants, NaI and AgNO₃, instead of formic acid for the ionization of exhaled breath molecules is discussed. Additionally, the solvent composition was altered by using a mixture of H₂O and methanol. NaI as dopant did not produce [M+Na]⁺ adducts as the major product, while AgNO₃ led to the formation of [M+Ag]⁺ adducts. As expected, AgNO₃ was capable of ionizing more compounds that got annotated with sulfur-containing molecular formulae. Conducting SESI-HRMS measurements with silver-doped electrosprays is therefore an interesting addition to standard formic acid-based measurements.

Due to the direct infusion nature of SESI-HRMS, higher levels of annotation can only be attained by the use of hyphenated MS techniques. To test the validity of using hyphenated methods for SESI-HRMS feature annotation, the overlap of features detected on-line with SESI-HRMS and features detected in exhaled breath condensate were compared. An improved gas-chromatography (GC)-MS method and liquid chromatography (LC)-MS were used to analyze the exhaled breath condensate of volunteers. The GC-MS method detected mostly exogenous compounds related to oral hygiene products. LC-MS indicated that the largest part of its detected features related to compounds containing amines. A fourth of all features detected on-line had a corresponding match detected with LC-MS, but only a 5% match with GC-MS features. These results indicate the need for improved sensitivity with hyphenated techniques for breath condensate analysis.

SESI-HRMS itself is not a quantitative technique and requires

gas standards for quantification. An evaporation-based system was therefore adapted for SESI-HRMS to produce low-concentration gas standards. Standards of short-chain fatty acids were generated under dry and humid conditions reaching concentrations as low as a few parts per trillion. To estimate the viability of this system to provide external calibration, the matrix effect ion suppression was characterized. It was demonstrated that the signal of gaseous compounds can be suppressed by elevated concentrations of other gases. In addition, compounds with high gas-phase basicity seem to suppress other ones with lower basicities. An estimation of ion suppression at breath acetone levels revealed a signal loss of approximately 30%. Consequentially, quantifying exhaled breath compounds with SESI-HRMS is the most accurate if standard addition is conducted. The evaporation-based gas standard system was therefore integrated into an apparatus, which can dilute exhaled breath and spike standards into breath. The dilution was shown to be useful for filtering features for untargeted metabolomics due to the dilution behavior of the feature signals. Standard addition was shown to be possible by spiking known concentrations of butyric acid and pyridine into exhaled breath. The described apparatus has thus been shown to be a valuable tool for quantitative work with SESI-HRMS.

Zusammenfassung

Die Analyse von Molekülen in Atemluft ist eine nichtinvasive Methode, um den menschlichen Gesundheitszustand zu charakterisieren. Allerdings existieren nur wenige von der FDA zugelassene diagnostische Tests, die ausserdem nur $^{13}\text{CO}_2$ nach Einnahme markierter Substrate detektieren. Es existieren keine Tests die endogene Moleküle für die Diagnose nutzen. Daher braucht die Atemanalytik bessere Methoden und Arbeitsabläufe. Die atmosphärische Ionisierungsmethode sekundäre Elektrosprayionisierung (SESI) verbunden mit hochauflösender Massenspektrometrie (HRMS) ist eine sensitive Methode für die Echtzeit-Atemanalytik. Diese Methode hat das Potential, Biomarker in der Atemluft zu finden. Damit dieses Potential realisiert werden kann, wurden in dieser Dissertation diverse Herausforderungen verbunden mit Atemanalytik durch SESI-HRMS beleuchtet. Diese Herausforderungen beinhalten biologische Variablen, die die Datenanalyse erschweren, sowie die Identifikation und Quantifizierung von potentiellen Kandidaten.

In dieser Dissertation wird die Veränderung der Atemluftzusammensetzung nach Einnahme einer standardisierten Mahlzeit diskutiert. Elf Studienteilnehmer tranken einen Shake, der Zucker, Fett und Proteine beinhaltete. Die Atemluft wurde über einen Zeitraum von sechs Stunden gemessen. Die detektierten Signale wurden durch Vergleich mit Fasten der Nahrungseinnahme zugeordnet. Das Zeitverhalten dieser Signale wurde gruppiert und zeigte zeit-

nahe und verzögerte Effekte. Durch *in silico* Fragmentvergleiche und Pfadanalyse wurden bestimmte Signale dem Metabolismus von Linoleat und Butanoat, sowie dem *Krebs-Zyklus* und der Darmmikrobiomaktivität zugeordnet. Diese Resultate bilden die Basis, um den Einfluss der Nahrungsmiteleinahme auf den Atem einzuschätzen.

Des Weiteren wird der Gebrauch von unterschiedlichen Elektroprayzusätzen, NaI und AgNO₃, anstelle von Ameisensäure diskutiert. Auch wurde die Zusammensetzung des Lösungsmittels angepasst durch das Verwenden einer Wasser-Methanol-Mischung. Der Zusatz von NaI führte nicht zur Bildung von Addukten der Form [M+Na]⁺ als Hauptprodukt, doch mit AgNO₃ gelang die Bildung von [M+Ag]⁺ Addukten. Wie erwartet führte der Gebrauch von AgNO₃ zur Detektion von mehr Signalen, denen eine schwefelhaltige Molekülformel zugeordnet werden konnte. Der Gebrauch von Silber als Elektroprayzusatz ist daher eine interessante Alternative zu den standardmässigen Messungen mit Ameisensäure.

Aufgrund der direkten Injektion von SESI in das Massenspektrometer sind die die zuverlässigsten Identifikationsstufen nicht erreichbar und können nur durch gekoppelte HRMS-Methoden erreicht werden. Um das Vermögen von gekoppelten Methoden zur Identifizierung von SESI-HRMS Signalen zu testen, wurde die Schnittmenge zwischen SESI-HRMS Signalen und Molekülen in Atemkondensat untersucht. Eine verbesserte Gaschromatographie(GC)- und eine Flüssigchromatographie(LC)-Massenspektrometriemethode wurden verwendet um das Atemkondensat von Freiwilligen zu untersuchen. Die GC-MS-Methode detektierte vor allem Substanzen, die mit Mundhygieneprodukten in Verbindung stehen. Durch die LC-MS-Methode wurden zum grössten Teil Amine im Atemkondensat gefunden. Ein Viertel

aller Signale, die mit SESI-HRMS detektiert wurden hatten ein korrespondierendes Signal in den LC-MS Daten. Dies war mit GC-MS nur bei 5% der Signale der Fall. Diese Resultate unterstreichen die Notwendigkeit für sensitivere Methoden für die Atemkondensatanalyse.

SESI-HRMS ist selbst nicht quantitativ und braucht daher Standardgase für die Quantifizierung. Für die Produktion von Standardgasen mit tiefen Konzentrationen für SESI-HRMS wurde darum ein System basierend auf Verdunstung entwickelt. Standardgase von kurzkettingen Fettsäuren wurden unter trockenen und feuchten Bedingungen in tiefen Konzentrationen von wenigen Teilchen pro Billion produziert. Um einzuschätzen, ob dieses System für die externe Kalibrierung gebraucht werden kann, wurde der Matrix-Effekt der Ionensuppression untersucht. Es wurde gezeigt, dass das Signal von Gasen von anderen, höher konzentrierten Gasen erniedrigt werden kann. Zusätzlich wurde festgestellt, dass Gase mit niedriger Gasphasenbasizität von solchen mit hoher Basizität unterdrückt werden. Eine Schätzung der Ionensuppression bei Azetonkonzentrationen im Atem ergab, dass Signale im Schnitt um 30% reduziert wurden. Als Konsequenz ist Kalibration durch Standardaddition der akkurateste Weg, um Substanzen mit SESI-HRMS zu quantifizieren. Das auf Verdunstung basierende System wurde in einer Apparatur eingesetzt, die Atem verdünnen und Standardgase in den Atem injizieren kann. Durch die Verdünnung war es möglich Signale für die ungezielte Metabolomik zu filtern. Die Fähigkeit der Apparatur zur Standardaddition wurde durch die Injektion von Buttersäure und Pyridin in den Atem bewiesen. Die Beschriebene Apparatur ist daher ein nützliches Werkzeug für quantitative Messungen mit SESI-HRMS.