

ICS 11.020
CCS 0.61

团 体 标 准

T/JPMA XXX—2026

血清中尼古丁和可替宁的测定 液相色谱-质谱法

Determination of nicotine and cotinine in serum by liquid chromatography-mass spectrometry

(送审稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

江苏省预防医学会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 原理 1

4 试剂与材料 1

5 仪器与设备 2

6 血清样品的制备与保存 2

7 分析步骤 2

8 分析结果的表述 3

9 检出限与定量限 3

10 质量控制与质量保证 3

附录 A（资料性） 质谱参考条件..... 4

附录 B（资料性） 标准溶液和样品提取离子色谱图..... 5

附录 C（资料性） 方法学参数..... 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由扬州市疾病预防控制中心（扬州市卫生监督所）（扬州市医学检验中心）提出。

本文件由江苏省预防医学会归口。

本文件起草单位：扬州市疾病预防控制中心（扬州市卫生监督所）（扬州市医学检验中心）、江苏省疾病预防控制中心（江苏省预防医学科学院）、无锡市疾病预防控制中心、宿迁市疾病预防控制中心、徐州市疾病预防控制中心、南京鼓楼医院集团仪征医院。

本文件主要起草人：徐勤、熊文、孙宏、夏俊鹏、张昊、周乐、吴飞、王冰、陈晨、徐小培、朱娴、吴宇伉、潘春燕、张玉、陈鹏、仲巧巧、阎雪艳、程剑。

血清中尼古丁和可替宁的测定 液相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了血清中尼古丁和可替宁的液相色谱-质谱测定方法。

本文件适用于血清中尼古丁和可替宁的测定

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 38576 人类血液样本采集与处理

3 原理

血清样品经乙腈沉淀蛋白后，上清液经固相萃取柱除脂后，液相色谱-质谱仪测定，根据保留时间和特征离子对定性，同位素内标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，实验用水为GB/T 6682-2008规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 甲酸（ HCOOH ）：色谱纯。

4.1.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

4.1.3 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

4.1.4 甲酸铵（ CH_3NO_2 ）。

4.1.5 牛血清：市售。

4.2 试剂配制

4.2.1 10 mmol/L 甲酸铵（ $\text{pH}=3.0$ ）：称取 0.315 g 甲酸铵，用水溶解，甲酸调节 pH 为 3.0 并稀释至 500 mL。

4.2.2 乙腈水溶液（50%）：准确量取 500 mL 水，加入 500 mL 乙腈，混合均匀。

4.3 标准物质

4.3.1 尼古丁标准品（ $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$ ，CAS:54-11-5），纯度要求 $\geq 98\%$ ，或使用有证标准物质。

4.3.2 可替宁标准品（ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ ，CAS:486-56-6），纯度要求 $\geq 98\%$ ，或使用有证标准物质。

4.3.3 尼古丁- D_3 （ $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{D}_3\text{N}_2$ ，CAS:1173021-00-5）。

4.3.4 可替宁- D_3 （ $\text{C}_{10}\text{D}_3\text{H}_9\text{N}_2\text{O}$ ，CAS:110952-70-0）。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备液：准确称取 10.0 mg 尼古丁和可替宁标准品分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液，于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 3 个月。

4.4.2 内标储备液：准确称取 10.0 mg 尼古丁- D_3 和可替宁- D_3 标准品分别置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的内标储备液，于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中可保存 3 个月。

4.4.3 混合标准应用液：准确移取尼古丁和可替宁标准储备液各 0.10 mL 至 100 mL 容量瓶中，用乙腈水溶液稀释成 1000 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准应用液，临用现配。

4.4.4 混合内标应用液：准确移取尼古丁- D_3 和可替宁- D_3 标准储备液各 0.04 mL 至 100 mL 容量瓶中，用乙腈水溶液稀释成 400 $\mu\text{g/L}$ 的混合内标应用液，临用现配。

4.5 材料

- 4.5.1 固相萃取柱（用于除脂）。
- 4.5.2 亲水聚四氟乙烯针式滤器：孔径 0.22 μm 。
- 4.5.3 离心管：2 mL，聚丙烯材质。
- 4.5.4 采血管：不含抗凝剂。
- 4.5.5 固相萃取装置。

5 仪器与设备

- 5.1 液相色谱-三重四极杆质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 5.2 涡旋混合器。
- 5.3 高速离心机：转速 ≥ 10000 r/min。
- 5.4 冰箱：-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱和冷藏冰箱。
- 5.5 分析天平：感量为 0.01 mg 和 1 mg。
- 5.6 pH 计。

6 血清样品的制备与保存

参照GB/T 38576制备血清样品，标本采集后2小时内分离血清，在室温下保存不超过1天；血清样本在0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 的保存时间不超过7天，-80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可稳定保存3个月；允许使用冻融样品，冻融次数不宜超过3次，注意避光保存。

7 分析步骤

7.1 样品前处理步骤

取0.30 mL血清样品于2 mL离心管中，再加入混合内标应用液30 μL ，涡旋混匀1 min，加入0.90 mL乙腈，涡旋沉淀蛋白，高速离心机10000 rpm离心5 min，上清液转移至固相萃取柱除脂，滤液经0.22 μm 针式滤器过滤后上机测定。

7.2 液相色谱参考条件

- 7.2.1 色谱柱：两性离子键合硅胶色谱柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.7 μm ，或等效色谱柱。
- 7.2.2 流动相：A 相为 10 mmol/L 甲酸铵（pH=3.0）；B 相为乙腈；A:B=10:90（v:v）；等度洗脱。
- 7.2.3 流速：0.2 mL/min。
- 7.2.4 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.2.5 进样体积：2.0 μL 。

7.3 质谱参考条件

- 7.3.1 离子源：电喷雾电离源正离子模式（ESI+）。
- 7.3.2 辅助加热气温度：550 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.3.3 喷雾电压：5.5 kV。
- 7.3.4 气帘气：35 psi。
- 7.3.5 雾化气：40 psi。
- 7.3.6 辅助加热气：40 psi。
- 7.3.7 检测方式：多反应离子监测模式，两种化合物及其对应内标质谱参数见附录 A。

7.4 标准曲线的绘制

7.4.1 准确移取 1000 $\mu\text{g/L}$ 混合标准应用液 0 μL 、10 μL 、50 μL 、100 μL 、500 μL 、1000 μL 分别于 10 mL 容量瓶中，并加入混合内标应用液 0.25 mL，以 50%乙腈定容至刻度，标准系列溶液质量浓度为 0.0 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ ，尼古丁-D₃、可替宁-D₃ 质量浓度固定为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 。标准系列溶液按浓度由低到高依次注入液相色谱-质谱仪中，以目标待测物浓度为横坐标，目标待测物峰面积与其对应的内标峰面积比值为纵坐标进行线性回归，绘制标准曲线。

7.4.2 尼古丁和可替宁标准溶液提取离子色谱图见附录 B，线性相关系数、标准曲线方程、检出限和定量限见附录 C。

7.5 试样溶液的测定

7.5.1 定性测定：在同样测试条件下，试样溶液与标准溶液中两种化合物的保留时间之比，偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内；且检测到的相对离子丰度，应当与浓度相近的标准工作液中相对离子丰度一致，其丰度比偏差应符合表1要求。

表1 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~≤50	>10~≤20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7.5.2 定量测定：取试样溶液和相应的标准溶液进样测定，采用内标法定量，标准溶液及试样溶液中两种化合物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内，如果超出范围需稀释测定。

8 分析结果的表述

试样中两种化合物的含量按式（1）计算：

$$\rho = \rho_1 \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——实际样品被测组分浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

ρ_1 ——标准曲线计算的样品测定溶液被测组分浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

f ——样品稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

9 检出限与定量限

两种化合物的检出限和定量限详见附录C。

10 质量控制

10.1 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

10.2 空白试验

-80℃冰箱中保存牛血清，用时放至室温摇匀，采用相同的样品前处理步骤进行操作。每批样品，需做一次空白试验。尼古丁和可替宁检测结果应低于检出限。

附 录 A
(资料性)
质谱参考条件

表A.1给出了尼古丁、可替宁及其内标化合物的质谱参数。

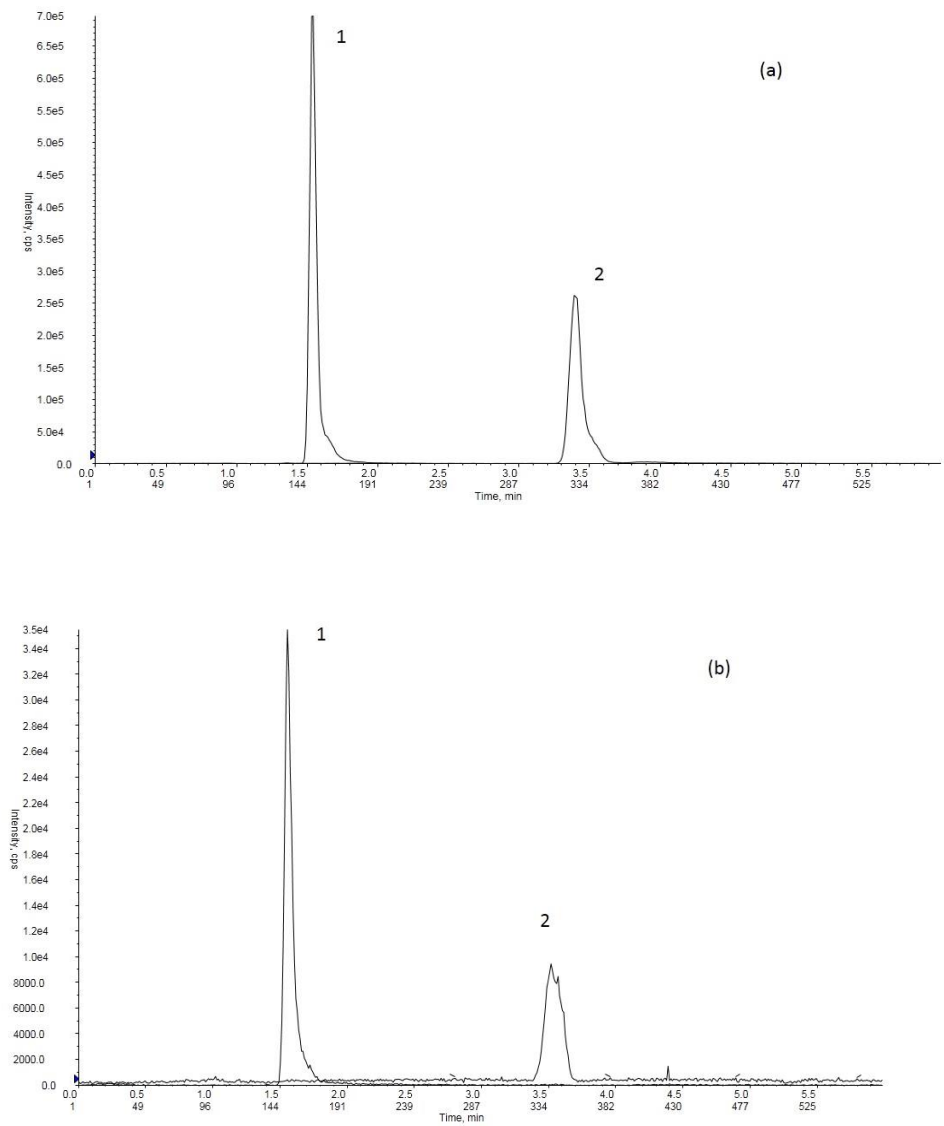
表A. 1 尼古丁、可替宁及其内标化合物的质谱参数

检测物质	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞电压(V)	保留时间 (min)
尼古丁	163.0	130.0*	70	30	3.04
	163.0	117.0	70	35	
可替宁	177.0	98.0	70	26	1.54
	177.0	80.0*	70	28	
尼古丁-D ₃	166.0	132.0	65	25	3.04
可替宁-D ₃	180.3	79.8	80	28	1.54

*为定量离子。

附 录 B
(资料性)
标准溶液和样品提取离子色谱图

图B给出了可替宁和尼古丁的标准溶液和样品的提取离子色谱图。



标引序号说明：1——可替宁 2——尼古丁

图B (a) 可替宁和尼古丁的标准溶液提取离子色谱图(质量浓度均为100 $\mu\text{g/L}$)
(b) 实际样品提取离子色谱图

附 录 C
(资料性)
方法学参数

表C.1给出的尼古丁和可替宁的线性方程、线性相关系数、检出限及定量限。

表C.1 尼古丁和可替宁的线性方程、线性相关系数、检出限及定量限

化合物	线性方程	线性相关系数 (<i>r</i>)	检出限/ (μg/L)	定量限/ (μg/L)
尼古丁	$y=0.18271x-0.01469$	0.9996	0.11	0.36
可替宁	$y=0.04034x+0.00231$	0.9987	0.02	0.06