



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105424853 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201510769728. 5

(22) 申请日 2015. 11. 12

(71) 申请人 上海迪安医学检验所有限公司

地址 200433 上海市杨浦区翔殷路 128 号上
海理工大学科技园 1 号楼 C309 室

(72) 发明人 周亚飞 于嘉屏

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 肖明芳

(51) Int. Cl.

G01N 30/88(2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

一种 LC-MS/MS 检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种 LC-MS/MS 检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,所述的代谢物为可替宁和 3-羟基可替宁;所述的试剂盒包括如下试剂:洗脱液:洗脱液 A:0.1% v/v 甲酸水溶液;洗脱液 B:0.1% v/v 甲酸甲醇溶液;混合标准液 A:含尼古丁、可替宁和 3-羟基可替宁的甲醇溶液;内标液 B:含氘代可替宁的内标溶液;稀释液:稀释液 1:非吸烟者唾液;稀释液 2:甲醇;有机溶剂:乙腈;质控品:含有尼古丁、可替宁和 3-羟基可替宁的非吸烟者唾液。利用本发明试剂盒进行检测灵敏度高、特异性强、准确且前处理过程简单,而且唾液样本采集方便且无创伤性,可用于评估吸烟、戒烟行为以及环境烟气暴露程度研究。

1. 一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,其特征在于,所述的代谢物为可替宁和3-羟基可替宁;

所述的试剂盒包括如下试剂:

(1)洗脱液:

洗脱液A:0.1%v/v甲酸水溶液;

洗脱液B:0.1%v/v甲酸甲醇溶液;

(2)混合标准液A:含尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的甲醇溶液;

(3)内标液B:含氘代可替宁的甲醇溶液;

(4)稀释液:

稀释液1:非吸烟者唾液;

稀释液2:甲醇;

(5)有机溶剂:乙腈

(6)质控品:含有尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的非吸烟者唾液,分高中低三个浓度度分别为QC(L)、QC(M)、QC(H);

其中,QC(L),QC(M),QC(H)中尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的对应浓度见表1;

表1 尼古丁及其代谢物质控品对应浓度单位ng/mL

	QC (L)	QC (M)	QC (H)
尼古丁	2	10	50
可替宁	2	10	50
3-羟基可替宁	2	10	50

2. 根据权利要求1所述的LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,其特征在于,所述的混合标准液A中,尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0 μ g/mL。

3. 根据权利要求1所述的LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,其特征在于,所述的内标液B中,氘代可替宁的浓度为1.0 μ g/mL。

4. 权利要求1所述LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒的制备方法,其特征在于,

(1)洗脱液:

洗脱液A:0.1%v/v甲酸水溶液;

洗脱液B:0.1%v/v甲酸甲醇溶液;

(2)混合标准液A:

分别准确称取10.0mg尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁,分别加入1mL甲醇溶解,配制成浓度均为10.0mg/mL标准品母液;分别从以上标准品母液中移取100 μ L用甲醇定容至1mL,稀释到浓度为1.0mg/mL,然后再用甲醇将这3种标准品的浓度由1.0mg/mL逐级稀释至10 μ g/mL;接着分别取1mL浓度为10 μ g/mL的尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁加入到15mL离心管中,再加去离子水定容到10mL,得到尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0 μ g/mL的混合标准液A;

(3)内标液B:

准确称取10.0mg氘代可替宁内标品,加入10mL甲醇溶解,得到浓度为1.0mg/mL的内标溶液;然后再用甲醇将内标溶液的浓度由1.0mg/mL稀释至1.0 μ g/mL,得到内标液B;

(4)稀释液:

稀释液1:非吸烟者唾液;

稀释液2:甲醇;

(5)有机溶剂:乙腈

(6)质控品:取混合标准液A 20 μ L、100 μ L、500 μ L分别用稀释液1定容至10mL得到QC(L)、QC(M)、QC(H)。

5. 权利要求1所述的LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒在检测唾液中尼古丁及其代谢物中的应用;其中,所述的代谢物为可替宁和3-羟基可替宁。

一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,属于分析检测技术领域。

背景技术

[0002] 尼古丁是烟草中的重要成分,主动吸烟和被动吸烟都会对身体产生不利影响,如心血管疾病、慢性阻塞性肺病甚至癌症,吸烟上瘾已成为当今社会危害公众健康的一大突出现状。尼古丁在人体内的主要代谢物有可替宁和3-羟基可替宁等多种物质,其中可替宁就占有所有代谢物的70%-80%。据报道,尼古丁及其代谢物在不同体液(血液、尿液和唾液)中的浓度水平与烟气暴露量密切相关,其含量水平可评估吸烟、戒烟行为以及环境烟气暴露程度。因此,建立一种快速准确的方法同时检测尼古丁及其代谢物至关重要。

[0003] 同样,标本的选择也很关键。目前已有方法用于血浆、尿液、唾液等样本的尼古丁代谢物的分析。尿液的采集较血液无创伤性,且尿液中的可替宁比血液中的含量高,但是尿样会受尿量的影响造成测定误差。研究数据显示,唾液可替宁和血液可替宁的相关性很高。因此,选择唾液标本作为尼古丁代谢物的测定是最简单可行的。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒,其中,所述的代谢物为可替宁和3-羟基可替宁;所述的试剂盒包括如下试剂:

[0007] (1)洗脱液:

[0008] 洗脱液A:0.1%v/v甲酸水溶液;

[0009] 洗脱液B:0.1%v/v甲酸甲醇溶液;

[0010] (2)混合标准液A:含尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的甲醇溶液;

[0011] (3)内标液B:含氘代可替宁的甲醇溶液;

[0012] (4)稀释液:

[0013] 稀释液1:非吸烟者唾液;本发明所述的非吸烟者唾液是非主动吸烟者且非被动吸烟者的唾液,该非吸烟者唾液未经前处理,购买试剂盒后可自行按照说明与待测唾液样本同步进行前处理;

[0014] 稀释液2:甲醇;

[0015] (5)有机溶剂:乙腈

[0016] (6)质控品:含有尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的非吸烟者唾液,分高中低三个浓度度分别为QC(L)、QC(M)、QC(H);

[0017] 其中,QC(L),QC(M),QC(H)中尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的对应浓度见表1;

[0018] 表1尼古丁及其代谢物质控品对应浓度单位ng/mL

	QC (L)	QC (M)	QC (H)
尼古丁	2	10	50
可替宁	2	10	50
3-羟基可替宁	2	10	50

[0020] 其中,所述的混合标准液A中,尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0 μ g/mL。

[0021] 其中,所述的内标液B中,氘代可替宁的浓度为1.0 μ g/mL。

[0022] 上述LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒的制备方法如下:

[0023] (1)洗脱液:

[0024] 洗脱液A:0.1%v/v甲酸水溶液;

[0025] 洗脱液B:0.1%v/v甲酸甲醇溶液;

[0026] (2)混合标准液A:

[0027] 分别准确称取10.0mg尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁,分别加入1mL甲醇溶解,配制成浓度均为10.0mg/mL标准品母液;分别从以上标准品母液中移取100 μ L用甲醇定容至1mL,稀释到浓度为1.0mg/mL,然后再用甲醇将这3种标准品的浓度由1.0mg/mL逐级稀释至10 μ g/mL;接着分别取1mL浓度为10 μ g/mL的尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁加入到15mL离心管中,再加去离子水定容到10mL,得到尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0 μ g/mL的混合标准液A;

[0028] (3)内标液B:

[0029] 准确称取10.0mg氘代可替宁内标品,加入10mL甲醇溶解,得到浓度为1.0mg/mL的内标溶液;然后再用甲醇将内标溶液的浓度由1.0mg/mL稀释至1.0 μ g/mL,得到内标液B;

[0030] (4)稀释液:

[0031] 稀释液1:非吸烟者唾液;

[0032] 稀释液2:甲醇;

[0033] (5)有机溶剂:乙腈

[0034] (6)质控品:取混合标准液A 20 μ L、100 μ L、500 μ L分别用稀释液1定容至10mL得到QC(L)、QC(M)、QC(H)。

[0035] 上述LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的试剂盒在检测唾液中尼古丁及其代谢物中的应用也在本发明的保护范围之内;其中,所述的代谢物为可替宁和3-羟基可替宁。

[0036] 一种LC-MS/MS检测唾液中尼古丁及其代谢物的方法,其中,所述的代谢物为可替宁和3-羟基可替宁;

[0037] 利用LC-MS/MS分别检测标准品溶液和经过预处理的唾液样品,利用同位素内标定量法,以标准品与内标物的浓度比为X轴,标准品与内标物峰面积比为Y轴,建立校准曲线,并计算出唾液中尼古丁及其代谢物的浓度,具体色谱条件为:

- [0038] (1)色谱条件：
 [0039] 流动相A:0.1%v/v甲酸水溶液；
 [0040] 流动相B:0.1%v/v甲酸的甲醇溶液；
 [0041] 色谱柱型号:Ultimate SiO₂,2.1×100mm,3μm；
 [0042] 流速为0.2mL/min；
 [0043] 柱温为35℃；
 [0044] 进样体积为10μL；
 [0045] 采用梯度洗脱的方式,见表2；
 [0046] 表2流动相梯度洗脱参数

	时间	流速 (mL/min)	%A	%B	
	01	00:01	0.2	80	20
	02	00:45	0.2	80	20
[0047]	03	01:15	0.2	15	85
	04	03:15	0.2	15	85
	05	04:05	0.2	20	20
	06	05:00	0.2	80	20

- [0048] (2)质谱条件：
 [0049] 在电喷雾电离正离子检测模式下,采用多反应监测的质谱扫描模式;喷雾电压为5500V;碰撞气为Medium;气帘气为40kPa;离子源雾化气和加热辅助气均为60kPa;去溶剂温度为550℃。
 [0050] 其中,所述的标准品溶液按照如下方法制备得到：
 [0051] 分别准确称取10.0mg尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁,分别加入1mL甲醇溶解,配制成浓度均为10.0mg/mL标准品母液;分别从以上标准品母液中移取100μL用甲醇定容至1mL,稀释到浓度为1.0mg/mL,然后再用甲醇将这3种标准品的浓度由1.0mg/mL逐级稀释至10μg/mL;接着分别取1mL浓度为10μg/mL的尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁加入到15mL离心管中,再加去离子水定容到10mL,得到尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0μg/mL的混合标准液A;
 [0052] 准确称取10.0mg氘代可替宁内标品,加入10mL甲醇溶解,得到浓度为1.0mg/mL的内标溶液;然后再用甲醇将内标溶液的浓度由1.0mg/mL稀释至1.0μg/mL,得到内标液B;
 [0053] 移取100μL混合标准液A于1.5mL离心管中,向其中加入100μL空白唾液基质作为第一个高值浓度点;移取20μL混合标准液A用空白唾液基质定容至200μL得到第二个浓度点;接着,移取10μL混合标准液A用空白唾液基质定容至500μL,取200μL作为第三个浓度点;分别取50、25、5μL的第三个浓度点分别定容至200μL,得到其它3个校准浓度点,这六个浓度点体积均为200μL;接着向其中各加入10μL 1μg/mL同位素内标液B,再加入400μL乙腈,然后涡旋数秒后振荡10min,14000r/min离心5min后取50μL上清液,再加入50μL去离子水,混匀后即得标准品溶液。
 [0054] 其中,所述的空白唾液基质为非吸烟者(指非主动吸烟者且非被动吸烟者)的唾液

基质。

[0055] 其中,所述的唾液样品按如下方法预处理得到:取200 μ L唾液于1.5mL离心管中,向其中加入10 μ L 1 μ g/mL内标液B,再加入400 μ L乙腈,然后涡旋数秒后振荡10min,14000r/min离心5min后取50 μ L上清液,再加入50 μ L去离子水,混匀后即得唾液样品。

[0056] 其中,所述的内标液B按如下方法制备得到:准确称取10.0mg氘代可替宁内标品,加入10mL甲醇溶解,得到浓度为1.0mg/mL的内标溶液;然后再用甲醇将内标溶液的浓度由1.0mg/mL稀释至1.0 μ g/mL,得到内标液B。

[0057] 有益效果:本发明试剂盒灵敏度高、特异性强、准确且前处理过程简单,5min之内可完成分离和检测,精密度和稳定性满足要求,而且唾液样本采集方便且无创伤性,可用于评估吸烟、戒烟行为以及环境烟气暴露程度研究。

附图说明

[0058] 图1.尼古丁及其代谢物标准品的选择离子流图。

[0059] 图2.非吸烟者空白唾液中尼古丁及其代谢物的选择离子流图。

[0060] 图3.吸烟者唾液中尼古丁及其代谢物的选择离子流图。

具体实施方式

[0061] 根据下述实施例,可以更好地理解本发明。然而,本领域的技术人员容易理解,实施例所描述的内容仅用于说明本发明,而不应当也不会限制权利要求书中所详细描述的本发明。

[0062] 实施例1:

[0063] 1.材料

[0064] 方法学研究实验的样本来自于上海迪安医学检验所员工的唾液样本。

[0065] (1)仪器:API 4000⁺三重四级杆质谱仪(AB SCIEX公司);ekspert'ultra LC100液相色谱系统(配自动进样器);医用高速冷冻离心机(北京白洋医疗器械有限公司);超纯水仪(成都优普超纯科技有限公司);多管涡旋混合仪(杭州奥盛仪器有限公司);快速混匀器(姜堰市康泰医疗器材厂);可调移液器(Thermo Scientific 0.5~10 μ L,10~100 μ L,100~1000 μ L);玻璃仪器、烧杯、量筒等。

[0066] (2)试剂耗材:色谱纯甲醇、乙腈(Tedia High Purity Solvent Company.Inc);上海月旭科技色谱柱Ultimate SiO₂(2.1 \times 100mm,3 μ m);1.5mL离心管(AXYGEN,美国)。

[0067] (3)标准品:尼古丁、可替宁、3-羟基可替宁和稳定同位素内标可替宁-d₃购自于加拿大Toronto Research Chemical Inc.公司,纯度均 \geq 98%。

[0068] (4)质控品:含有尼古丁、可替宁、3-羟基可替宁的空白唾液基质溶液,分高中低三个浓度分别为QC(L)、QC(M)、QC(H),见表1所示。

[0069] 2.方法

[0070] (1)色谱条件:流动相A:0.1%v/v甲酸水溶液;流动相B:0.1%v/v甲酸的甲醇溶液。色谱柱型号:Ultimate SiO₂(2.1 \times 100mm,3 μ m),采用梯度洗脱的方式,详见表2。流速为0.2mL/min,柱温为35 $^{\circ}$ C,进样体积为10 μ L。

[0071] (2)质谱条件:在电喷雾电离(electrospray ionization,ESI)正离子检测模式

下,采用多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)的质谱扫描模式。喷雾电压(ionspray,IS)为5500V;碰撞气(collision gas,CAD)为Medium;气帘气(curtain gas,CUR)为40kPa;离子源雾化气(ion source GS1,GS1)和加热辅助气(GS2)均为60kPa;去溶剂温度为550°C。

[0072] (3)标准品配制:

[0073] 分别准确称取10.0mg尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁,分别加入1mL甲醇溶解,配制成浓度均为10.0mg/mL标准品母液;分别从以上标准品母液中移取100 μ L用甲醇定容至1mL,稀释到浓度为1.0mg/mL,然后再用甲醇将这3种标准品的浓度由1.0mg/mL逐级稀释至10 μ g/mL;接着分别取1mL浓度为10 μ g/mL的尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁加入到15mL离心管中,再加去离子水定容到10mL,得到尼古丁、可替宁和3-羟基可替宁的浓度均为1.0 μ g/mL,配制成混合标准液A。

[0074] 准确称取10.0mg氘代可替宁内标品,加入10mL甲醇溶解,得到浓度为1.0mg/mL的内标溶液。然后再用甲醇将内标溶液的浓度由1.0mg/mL稀释至1.0 μ g/mL,得到内标液B。

[0075] (4)质控品的配制:取混合标准液A 20 μ L、100 μ L、500 μ L分别用非吸烟志愿者的空白唾液定容至10mL得到。

[0076] (5)样品处理

[0077] 1)标准品的制备及前处理:移取100 μ L混合标准液A于1.5mL离心管中,向其中加入100 μ L空白唾液基质作为第一个高值浓度点;移取20 μ L混合标准液A用空白唾液基质定容至200 μ L得到第二个浓度点;接着,移取10 μ L混合标准液A用空白唾液基质定容至500 μ L,取200 μ L作为第三个浓度点;分别取50、25、5 μ L的第三个浓度点分别定容至200 μ L,得到其它3个校准浓度点,这六个浓度点体积均为200 μ L。接着向其中各加入10 μ L 1 μ g/mL同位素内标液B,再加入400 μ L乙腈,然后涡旋数秒后振荡10min,14000r/min离心5min后取50 μ L上清液,再加入50 μ L去离子水,混匀后移入色谱瓶中上样进行LC-MS/MS分析。

[0078] 2)唾液样品前处理:取200 μ L唾液于1.5mL离心管中,向其中加入10 μ L 1 μ g/mL内标液B,再加入400 μ L乙腈,然后涡旋数秒后振荡10min,14000r/min离心5min后取50 μ L上清液,再加入50 μ L去离子水,混匀后移入色谱瓶中上样进行LC-MS/MS分析。

[0079] 3)质控品前处理:分别取质控品溶液QC(L),QC(M),QC(H)各200 μ L于1.5mL离心管中,然后跟唾液样品前处理方法一致,此处不再赘述。

[0080] 分析试剂盒中各组分见表3。

[0081] 表3尼古丁及其代谢物分析试剂盒组分的制备

[0082]

组成	配方	规格
洗脱液	A: 0.1% v/v 甲酸水溶液	500 mL
	B: 0.1% v/v 甲酸甲醇溶液;	500 mL
标准品母液 A	含浓度均为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的尼古丁、可替宁和 3-羟基可替宁的甲醇溶液	1 mL
内标液 B	含浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的氘代可替宁内标溶液	1 mL
稀释液	1: 非吸烟者空白唾液	10 mL
	2: 甲醇	20 mL
有机溶剂	乙腈 (用于沉淀蛋白)	50 mL
质控品	QC(L) 具体见表 1	0.5 mL

[0083]

	QC(M) 具体见表 1	0.5 mL
	QC(H) 具体见表 1	0.5 mL
色谱柱	月旭科技色谱柱 Ultimate SiO ₂ (2.1 \times 100 mm, 3 μm)	(可选)

[0084] 3、方法的建立与优化

[0085] 为了达到更高的稳定性和灵敏度,实验采用MRM模式同时监测尼古丁、可替宁、3-羟基可替宁以及d₃-可替宁的离子对(Q1/Q3),使用“Ramp”对不同离子对的去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞电压(collision energy, CE)和碰撞池出口电压(collision cell exit potential, CXP)等条件进行了系统优化,从优化色谱图中即可得到离子最高信号强度所对应的最佳结果,记录优化结果见表4。此外,其它一些参数如IS、CAD、CUR、GS1和GS2等根据仪器提供的参考值范围选择合适的数值,以保证稳定的信号强度。

[0086] 表4尼古丁及其代谢物质谱参数优化结果

类固醇激素	保留时间 RT/min	MRM 监测离子对 (Q1/Q3)	DP	CE	CXP
尼古丁	1.8	163.1 \rightarrow 132.2	60	12	10
可替宁	1.5	177.1 \rightarrow 79.9	45	32	12
3-羟基可替宁	1.4	193.2 \rightarrow 79.9	65	40	12
d ₃ -可替宁	1.5	180.2 \rightarrow 79.9	56	33	10

[0087]

[0088] 4、方法验证

[0089] a. 选择离子流图: 尼古丁及其代谢物的标准品和吸烟者唾液样品的选择离子流色谱图(XIC)如下图所示, 图1中尼古丁、可替宁和3-OH可替宁的浓度均为5.0ng/mL, 完全无杂峰干扰, 说明在此条件下能够得到良好的检测。图2和图3分别为非吸烟者和吸烟者唾液中尼古丁、可替宁和3-OH可替宁的XIC谱图, 由于吸烟者唾液复杂基质的干扰, 使得谱图中的峰型对称性不佳, 但不会影响LC-MS/MS的检测。

[0090] b. 校准曲线: 采用同位素内标定量法, 利用Analyst软件以标准物与内标物的浓度比为X轴, 标准物与内标物峰面积比为Y轴, 建立校准曲线, 并计算出唾液中待测物的浓度。3种分析物在各自浓度范围内线性良好, 相关系数在0.998以上, 满足定量要求, 见表5。同时, 试剂盒也考察了这3种分析物在信噪比 $S/N \geq 10$ 时的最低定量限(LLOQ), 可低至0.5ng/mL, 完全可以满足吸烟者唾液样本中尼古丁及其代谢物的检测需求。

[0091] 表5尼古丁及其代谢物线性系数和最低定量限

分析物	曲线浓度 (ng/mL)	线性系数 (r)	LLOQ ($S/N \geq 10, n=6$)		
			平均浓度	S/N	CV%
[0092] 尼古丁	0.5-500	0.9983	2.0	11	10.3
可替宁	0.5-500	0.9997	0.5	13	7.0
3-羟可替宁	0.5-500	0.9996	0.5	20	3.2

[0093] c. 精密度试验: 取正常人唾液样品一天内重复处理6次, 以同位素内标法定量测定3种物质的浓度, 得出批内精密度的5.0%~8.41%(见表6); 6个标本分3日按照相同的方法处理并测定, 计算得到批间精密度的6.16%~10.65%(见表7)。

[0094] 表6批内精密度试验结果

	尼古丁	可替宁	3-羟基可替宁
1	1970	2.69	0.513
2	1980	2.78	0.507
3	1810	2.73	0.464
4	1750	2.87	0.427
[0095] 5	1870	2.47	0.431
6	1810	2.52	0.509
AVE	1865	2.68	0.475
SD	93.33	0.154	0.040
批内 CV%	5.0	5.75	8.41

[0096] 表7批间精密度试验结果

	尼古丁	可替宁	3-羟基可替宁	
[0097]	1	1610	2.59	0.383
	2	1560	2.77	0.392
	3	1480	2.51	0.408
	4	1750	2.87	0.427
	5	1870	2.47	0.431
[0098]	6	1810	2.52	0.509
	AVE	1680	2.622	0.425
	SD	153.1	0.162	0.045
	批间 CV%	9.11	6.16	10.65

[0099] 本试剂盒采用高效液相色谱串联质谱技术(HPLC-MS/MS)可同时测定人体唾液尼古丁及其代谢物可替宁和3-羟基可替宁。目前,用于测定尼古丁及其代谢物的方法较多,如免疫法、比色法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)和液相色谱-串联质谱法,大多用于研究尿液或血液中的尼古丁及其代谢物,而唾液检测相对较少,而且免疫法可能存在交叉反应的干扰。其中GC-MS准确性较高,但该方法基本都需要对样品进行衍生化处理,操作过于繁琐,而且灵敏度较低。而LC-MS/MS是同时针对目标物的出峰时间和离子对进行检测,灵敏度高,极大的避免了交叉反应的干扰。本试剂盒采用同位素内标法定量,选择氘代可替宁作为3种物质共用的内标,不但节省了成本,而且可减少基体的干扰,不受预处理过程、上样体积和流动相等条件的影响,能够达到准确定量。而且灵敏度高,最低定量限可达到0.5ng/mL,完全可以满足吸烟者唾液样本中尼古丁及其代谢物的检测需求。

[0100] 本试剂盒还考察了方法的精密度,日内精密度的为5.0%~8.41%,日间精密度的为6.16%~10.65%(可接受标准为 $CV \leq 15\%$),因此该试剂盒稳定性良好。

[0101] 总之,该试剂盒灵敏度高、特异性强、准确且前处理过程简单,5min之内可完成分离和检测,精密度和稳定性满足要求,而且唾液样本采集方便且无创伤性,可用于评估吸烟、戒烟行为以及环境烟气暴露程度研究。

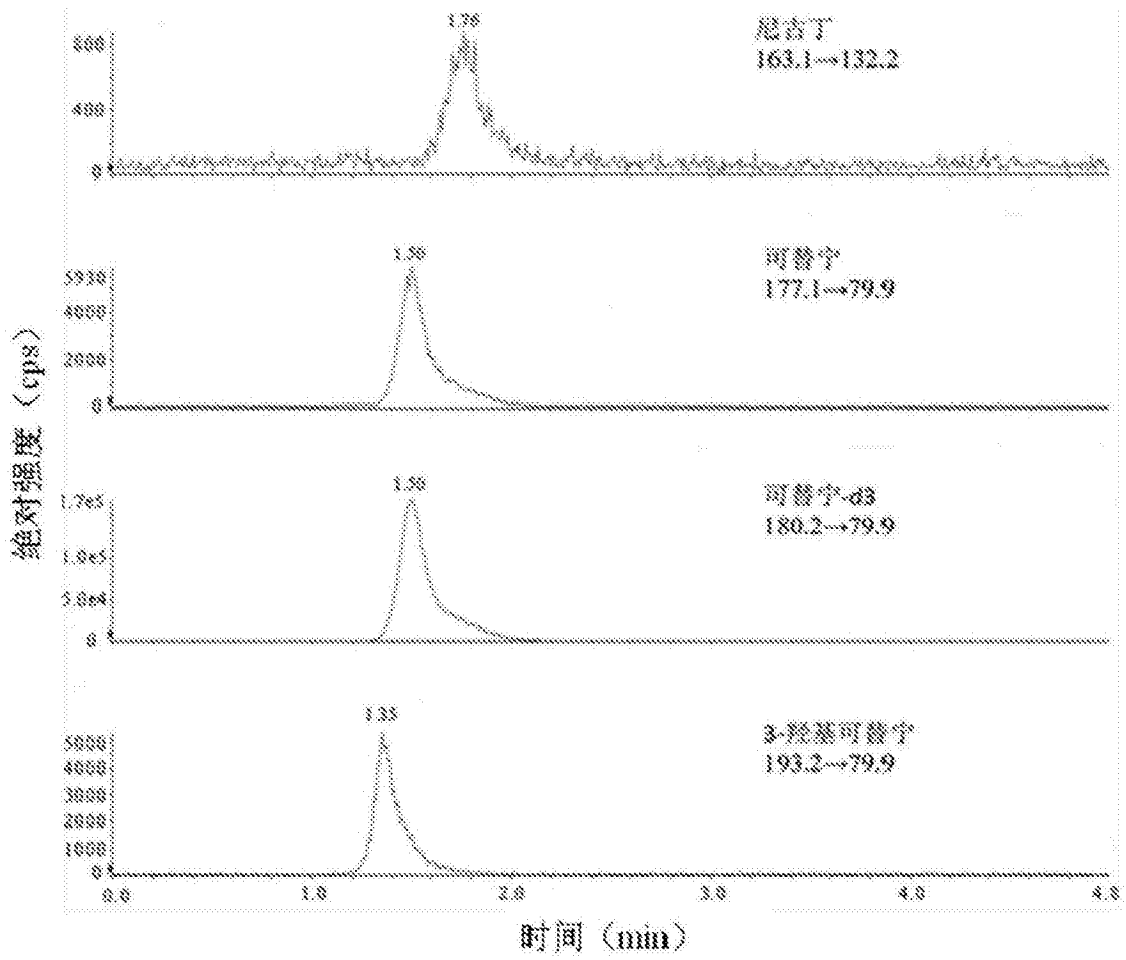


图1

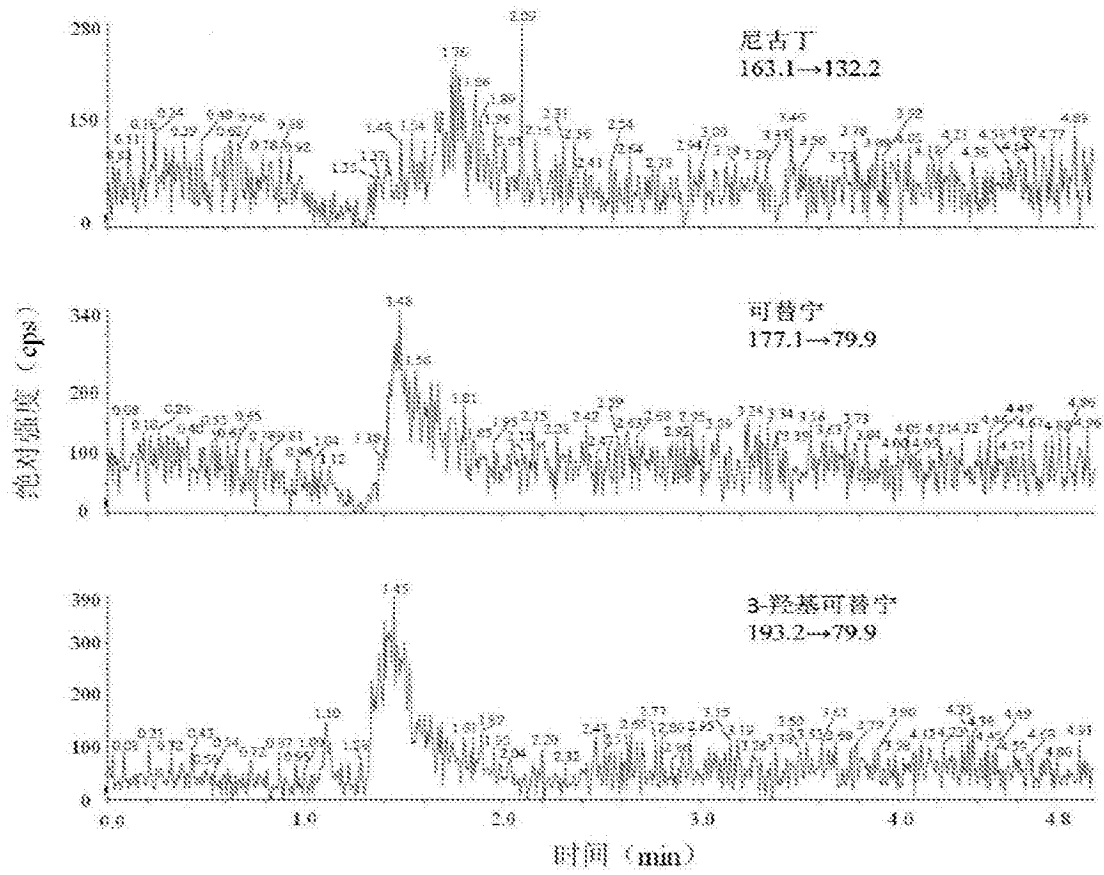


图2

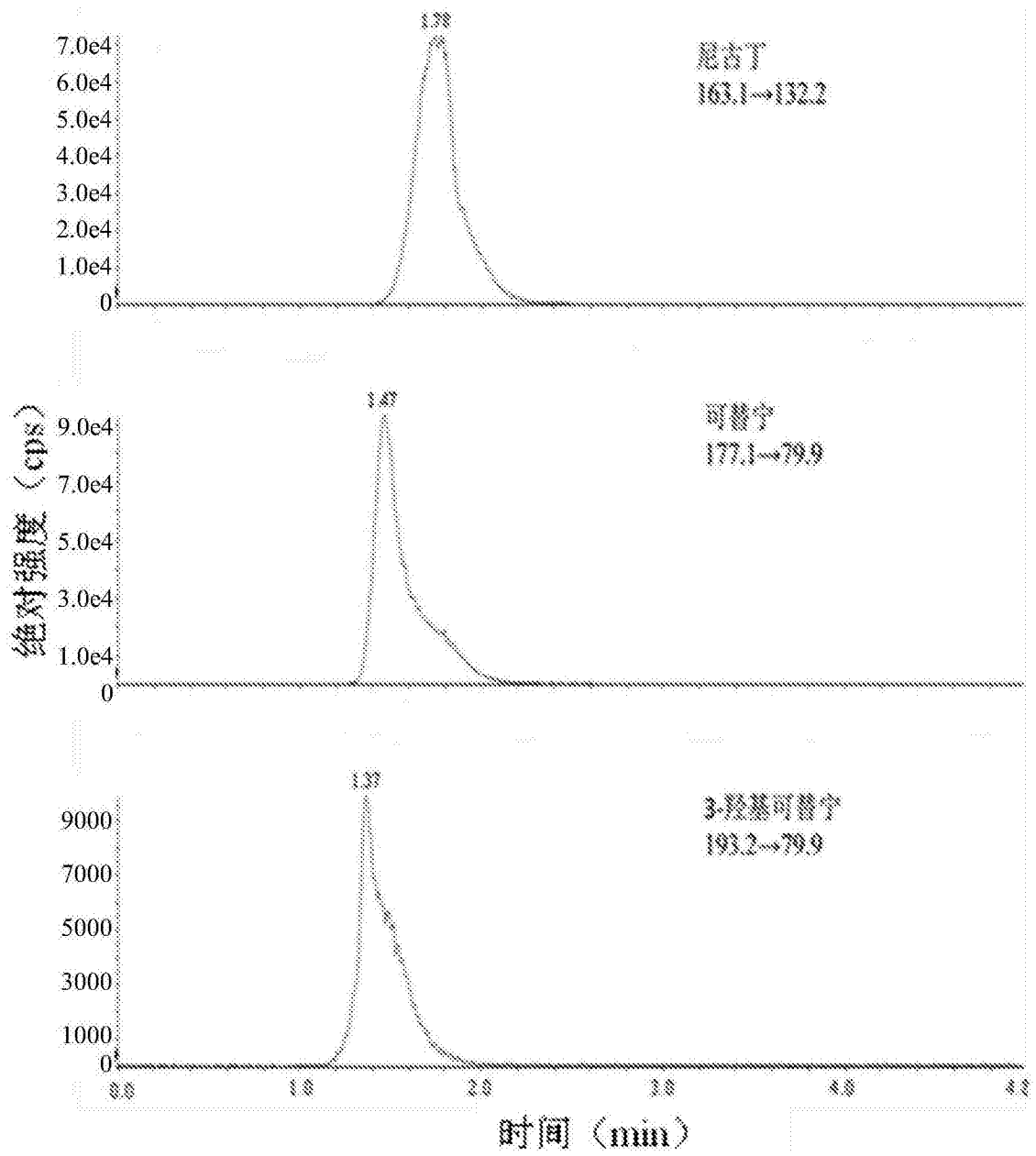


图3