·检验技术·

尿液中尼古丁和可替宁 QuEChERS 预处理气相色谱测定法建立*

范茂林，杨旭东，艾雨，甘霖，洪志轩，高洁莹

摘　要：目的　建立同时检测尿液中尼古丁和可替宁的 QuEChERS 样品预处理－气相色谱法。**方法**　于 2015 年 11 月 22 日—12 月 12 日，采集重庆医科大学 6 例吸烟者和 10 例不吸烟者尿液样本，通过 QuEChERS 提取和净化后，经非极性的 DB-5 ms 毛细管色谱柱分离，氢火焰离子化检测器（FID）检测，保留时间定性，峰面积定量。**结果**　尿液中尼古丁和可替宁的线性范围分别为 0.5～500 μg/mL（r=0.999 8）和 5～500 μg/mL（r=0.998 9），最低检出限（LOD）分别为 0.09 和 0.75 μg/mL。2 种待测物日内的相对误差（RE）和变异系数（CV）<10.0%，日间 RE 和 CV < 10.4%。尼古丁和可替宁的加标回收率分别在 93.2%～107.8% 和 94.6%～99.2% 范围内。**结论**　建立的方法操作简单、快速、成本低且有机试剂用量少，适于暴露者的烟草暴露剂量评估。

关键词：QuEChERS；气相色谱法；尿液；尼古丁；可替宁

中图分类号：R 446.12　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2017)02-0333-05　DOI：10.11847/zgggws2017-33-02-43

Determination of nicotine and cotinine in urine with QuEChERS sample preparation-gas chromatography

FAN Mao-lin, YANG Xu-dong, AI Yu, et al (*College of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing* 400016, China)

Abstract: Objective　To develop a QuEChERS-gas chromatography method for simultaneous determination of nicotine and cotinine in urine samples. **Methods**　Urine samples were collected from 6 smokers and 10 non-smokers at Chongqing Medical University; then the samples were extracted and purified with quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) method and then separated via a non-polar DB-5 ms capillary chromatographic column and determined with flame ionization detector (FID). Qualitative and quantitative analyses were performed using retention time and peak area. **Results**　The linear ranges of nicotine and cotinine for the detected samples were 0.5－500 μg/mL (r=0.9998) and 5－500 μg/mL (r=0.998 9), with the limit of detection (LOD) of 0.09 μg/mL and 0.75 μg/mL, respectively. The intra-day and inter-day relative error (RE) and coefficient of variation (CV) of nicotine and cotinine detections were less than 10.0% and 10.4%. The mean recoveries of nicotine and cotinine were 93.2%－107.8% and 94.6%－99.2%, respectively. **Conclusion**　The method developed is simple, fast, cost-effective, and suitable for the assessment of tobacco exposure dose and the detection of metabolic dynamics of tobacco exposure.

Key words: QuEChERS; gas chromatography; urine; nicotine; cotinine

烟草的使用是重要的公共健康问题[1]。吸烟者每天吸入的烟草剂量与某些吸烟有关疾病发生风险有相关性[2]。烟草中的生物碱是主要活性成分。在已发现的 20 多种生物碱中，尼古丁含量最高，占总生物碱的 98%。尼古丁易使人上瘾并产生依赖性，长期吸入会损害人体健康[3-4]。在人体内，尼古丁可经细胞色素氧化酶（cytochrome P450 2A6, CYP2A6）代谢转化为可替宁[5]。研究发现，人体唾液、血液及尿液中均能检测到尼古丁和可替宁[6-7]。因此，尼古丁和可替宁被广泛用于评估暴露者的烟草暴露剂量和程度的生物标志物。本研究基于改进的 QuEChERS（quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe）预处理技术，于 2015 年 11 月 22 日—12 月 12 日采集重庆医科大学 6 例吸烟者和 10 例不吸烟者尿液样本，建立一种适于同时检测尿液中尼古丁和可替宁的气相色谱法。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂　GC 9720 气相色谱仪附氢火焰离子化检测器（浙江福立公司）；Fresco 17 冷冻离心机（德国 Thermo Fisher 公司）；Millipore 超纯水过滤装置（美国 Millipore 公司）；VORTEX－QIL-INBEIER 5 旋涡振荡器（美国 Scientific Instrument 公司）；FA1004A 电子天平（上海精天公司）；针头过

* **基金项目：**国家自然科学基金（21403021）；重庆市科委基础与前沿研究项目（cstc2013jcyjA20004）；重庆市大学生创新创业训练计划项目（201610631065）

作者单位：重庆医科大学公共卫生与管理学院，重庆 400016

作者简介：范茂林（1994－），女，四川人，本科在读，研究方向：食品与生物材料检验。

通讯作者：高洁莹，E-mail：jygao@cqmu.edu.cn

数字出版日期：2017－1－17 13：40

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20170117.1340.008.html

滤器(0.22 μm,天津津腾公司)。尼古丁(纯度 ≥ 98%)、可替宁(纯度 ≥ 98%)和内标喹啉(纯度 ≥ 99%)标准品(美国 Sigma-Aldrich 公司);一级二级胺(primary secondary amine, PSA, 60 μm)、石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB, 60 μm)、十八烷基硅烷(octadecysilane, end-capped, C18EC, 60 μm)和无水硫酸镁(纯度 > 98.5%)(美国 Agilent 公司);色谱级的甲醇、乙腈和氨水(美国 Fisher 公司);实验用水经 MilliQ™ 系统纯化。

1.2　*受试者尿液采集*　2015 年 11 月 22 日—12 月 12 日,简单随机抽样方法收集重庆医科大学 6 例吸烟者标本,年龄 17 ~ 23 岁,烟龄 1 ~ 3 年,均为男性,采集尿样用于实际样本分析。同时收集重庆医科大学 10 份不吸烟者尿样作为空白样,混匀分装。10 份空白样标本与吸烟组标本年龄、性别匹配,并排除被动吸烟情况。

1.3　*方法*

1.3.1　标准溶液配制　分别称取一定量的尼古丁、可替宁和喹啉标准品,用甲醇配制成 1 mg/mL 标准储备液,于 -20 ℃ 冰箱保存备用。临用时,取尼古丁和可替宁标准溶液,加入一定量的喹啉标准液作为内标,用甲醇稀释成不同浓度的混合标准工作液。

1.3.2　样本采集和预处理　采集受试者尿液分装于 50 mL 离心管中,置于 -20 ℃ 下保存。样本预处理:(1)　提取 取尿样 5 mL,加入 50 μL 20 μg/mL 内标溶液,涡旋混匀 1 min 后,用氨水调节 pH 至 8。加入 4 mL 乙腈和 5 g 无水硫酸镁后,立即剧烈振摇 1 min 以防止无水硫酸镁凝聚成块,8 000 g 离心 10 min。(2)　净化另取 1 支 1.5 mL 离心管,分别加入 25 mg PSA, 25 mg GCB 和 100 mg 无水硫酸镁。将 1 mL 离心后的上清液转移至此离心管中,立即剧烈振摇 1 min, 10 000 g 离心 20 min。上清液经0.22 μm过滤器过滤后,取 1 μL 进样分析。

1.3.3　气相色谱样本分析　色谱分离选用 DB-5 ms 毛细管气相色谱柱(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm);进样口温度 290 ℃;接口温度 280 ℃;检测器温度 290 ℃;N_2 流量 30 ml/min,分流比 40;H_2 流量 30 ml/min;O_2 流量 300 ml/min;柱温:初始温度 50 ℃,保持时间 1 min,以升温速率15 ℃/min升温至 200 ℃,保持时间 1 min;再以升温速率 20 ℃/min升至最终温度 300 ℃;进样量 1 μL。

1.4　*统计分析*　采用 Origin 7.0 进行线性拟合,以待测物峰面积与内标峰面积之比减去空白样中待测物峰面积与内标峰面积之比 y 对待测物浓度 x 进行回归分析,计算线性回归方程。根据实际样本的峰面积比值,由回归方程计算样本中尼古丁和可替宁的含量。采用 Origin 7.0 进行待测物的代谢动力学浓度 - 时间曲线拟合。采用 Excel 2003 进行样本浓度的变异系数(coefficient of variation, CV)和相对误差(relative error, RE)计算。CV = (标准偏差/平均值) × 100%;RE = (绝对误差/真实值) × 100%。

2　结　果

2.1　*样本预处理条件的确定*

2.1.1　提取剂的确定(图 1)　尼古丁分子中有 2 个氮原子(pK_a 值分别为 6.16 和 10.96),在酸性介质中不稳定,易形成双盐形式,降低提取效率。结果显示,当用氨水调节尿液基质至 pH 8 时,2 种待测物的提取效率最高。选择等量的甲醇、乙腈和苯作为提取剂,考察其对尼古丁和可替宁的提取效率。与甲醇和苯相比,经乙腈处理的样本,杂质峰明显减少,且尼古丁和可替宁的峰面积较大、重现性较好。因此,本研究选择乙腈作为提取剂。接着,比较了 3、3.5、4、4.5、5 mL 5 个乙腈不同加入体积对提取效率的影响。结果显示,经 4 mL 乙腈提取后的待测物峰面积最大,且重现性相对较好[相对标准偏差 relative standard deviation(RSD) < 10%]。因此,本研究最终选择 4 mL 乙腈作为提取剂。

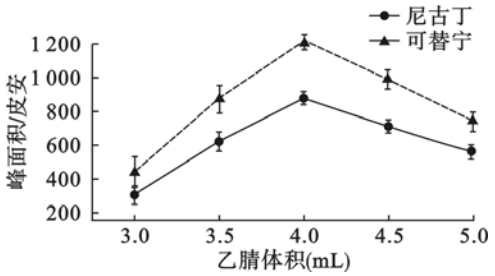


图 1　乙腈加入的体积对待测物提取效率的影响(n = 3)

2.1.2　吸附剂的确定(图 2)　QuEChERS 方法测定食品中农残常用的吸附剂有 PSA、C18EC 和 GCB 3 种。PSA 作为一种弱阴离子交换剂,主要用于除去基质中的有机酸、糖和色素等极性物质。C18EC 和 GCB 是 2 种非极性吸附剂,适于在极性样品中吸附非极性和中极性的化合物。尤其,GCB 有利于除去疏水相互作用的化合物,例如类胡萝卜素和叶绿素。本研究考察 7 种不同组合的吸附剂(PSA、C18EC、GCB、PSA + C18EC、PSA + GCB、C18EC + GCB、PSA + C18EC + GCB)对尿液中尼古丁和可替宁净化效率的影响。结果显示,采用PSA + GCB吸附剂组合测得的样本中 2 种分析物的峰面积最大,其净化效果最优。因此,选择 PSA + GCB 作为二元吸附剂用于尿液样本的净化。

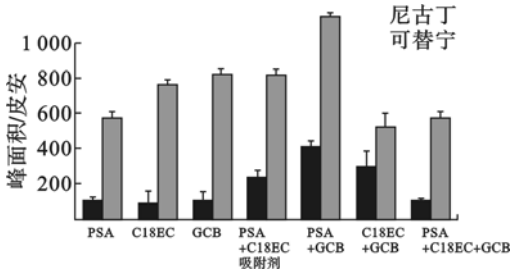


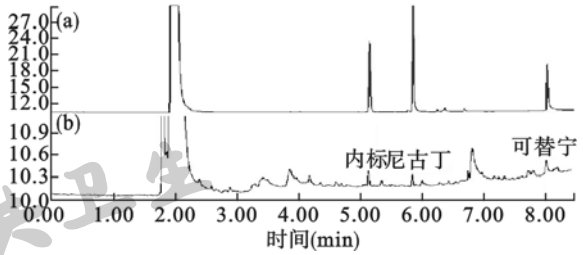
图 2　不同吸附剂组合对待测物净化效率的影响($n=3$)

2.2　色谱条件的选择

2.2.1　色谱柱的选择　选择合适的色谱柱可以很大程度地改善待测物的分离和保留行为。本研究比较了美国 Agilent 公司的 DB-5 ms(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)、DB-35 ms Ultra Inert(15 m × 0.25 mm, 0.25 μm)和 DB-1 ms(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)3 种毛细管色谱柱对分析物分离效果的影响。实验得出,相比中等极性填料的 DB-35 ms 色谱柱,采用非极性填料的 DB-5 ms 和 DB-1 ms 柱,2 种待测物的分离效果更好。尤其,采用 DB-5 ms 色谱柱,待测物的对称性最佳。因此,最终选择 DB-5 ms 色谱柱进行色谱分离。

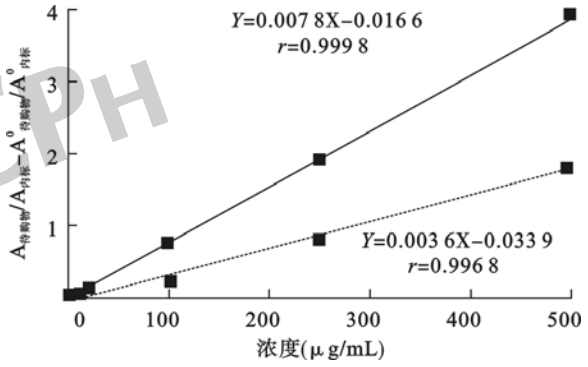
2.2.2　升温模式的选择(图 3)　本研究比较了等温和程序升温 2 种不同的模式。等温模式下,虽基线较平稳,但待测物的色谱峰出现展宽,且整个检测时间较长(20 min)。而采用程序升温后,不仅大大缩短了色谱分析的时间(8.5 min),而且待测物的分离度明显提高,峰形得到较大改善,程序升温的具体条件见 1.3.3。基于已优化的样本预处理条件和色谱条件,检测获取的加标样本和实际样本的色谱图分别呈现于图 3(a)和图 3(b)。由图可得,尼古丁和可替宁的保留时间分别为 5.9 mim 和 8.0 min,整个色谱分析时间为 8.5 min。

2.3　最低检出限(limit of detection, LOD)和最低定量限(limit of quantification, LOQ)(图 4)　配制含有内标的系列标准溶液 0、0.5、1、5、10、20、100、250、500 μg/mL,各取 50 μL 加入混合尿液中,按 1.3.2 节中"样本预处理"项操作,校准样品每个浓度平行测定 3 份。以尿液中加入待测物的浓度为横坐标,尿液中待测物峰面积与内标峰面积的比值减去空白尿液中待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线。结果显示,尼古丁的线性范围为 0.5 ~ 500 μg/mL,相关系数(r)为 0.999 8;可替宁的线性范围为 5 ~ 500 μg/mL, r = 0.998 9。LOD 和 LOQ 分别为产生性噪比(S/N)等于 3 和 10 时的最低浓度。尼古丁的 LOD 和 LOQ 分别为 0.09 μg/mL 和 0.30 μg/mL;可替宁的 LOD 和 LOQ 分别为 和 0.75 μg/mL 和 2.50 μg/mL。



注:(a)非吸烟者尿液加标;(b)吸烟者尿样。

图 3　尿液中尼古丁和可替宁的典型色谱图



注:实线:尼古丁;虚线:可替宁。

图 4　尼古丁和可替宁的标准曲线

2.4　准确度和精密度(表 1)　分别取含低、中、高浓度待测物的尿液样本进行准确度和精密度测定,按 1.3.2 节中"样本预处理"项操作。日内每个浓度水平重复测定 5 次,连续测定 5 d。准确度由浓度的相对误差(RE)表示;精密度由浓度的变异系数(CV)表示。测定结果见表 1。2 种待测物日内的 RE 和 CV 在 10.0% 以内,日间 RE 和 CV 在 10.4% 以内。

表 1　尿液中尼古丁和可替宁的准确度(RE)和精密度(CV)($\bar{x} \pm s$, $n=5$, μg/mL))

待测物	加标浓度(μg/mL)	日内			日间		
			RE(%)	CV(%)		RE(%)	CV(%)
尼古丁	10.0	11.0 ± 1.0	10.0	9.1	9.4 ± 0.9	−6.0	9.6
	100.0	108.0 ± 5.8	8.0	5.4	107.6 ± 8.4	7.6	7.8
	250.0	241.0 ± 9.4	−3.6	3.9	243.4 ± 11.6	−2.6	4.8
可替宁	10.0	10.4 ± 0.9	4.0	8.7	10.7 ± 1.0	7.0	9.3
	100.0	109.0 ± 8.9	9.0	8.2	110.4 ± 3.9	10.4	3.5
	250.0	258.0 ± 6.7	3.2	2.6	247.6 ± 10.4	−1.0	4.2

2.5　平均回收率(表 2)　在非吸烟人混合尿液中加入 50 μL 低、中、高 3 个浓度水平的混合标准液，按 1.3.2 节中“样本预处理”项操作，进行回收率测定。尼古丁的平均回收率在 93.2% ~107.8% 范围内；可替宁的平均回收率在 94.6% ~99.2% 范围内。

表 2　尿液中尼古丁和可替宁的平均回收率(n =5, μg/mL))

待测物	加标浓度(μg/mL)	测定浓度($x \pm s$)	回收率($x \pm s$)	CV(%)
尼古丁	10.0	10.8 ±0.8	107.8 ±7.9	7.3
	100.0	93.2 ±2.4	93.2 ±5.5	5.9
	250.0	247.5 ±6.2	99.0 ±3.9	3.9
可替宁	10.0	9.9 ±0.5	99.2 ±8.9	9.0
	100.0	95.3 ±1.2	95.3 ±6.0	6.3
	250.0	236.4 ±7.5	94.6 ±4.1	4.3

2.6　稳定性　将 1 mg/mL 尼古丁和可替宁标准品的混合储备液放置在 4 ℃冰箱冷藏，分别测定其放置 0、1、2、3、4 周后尼古丁和可替宁的含量，通过计算不同保存时间的降解率来判断标准品的稳定性。结果显示，尼古丁和可替宁标准品在 4 周内浓度无明显变化，其降解率 <5%。因此，标准品的混合储备液在 4 ℃条件下可保存 1 个月。将吸烟者的混合尿样按 1.3.2 节中“样本预处理”项操作后，分别测定其在室温下放置 0、1、10、24 h 后尼古丁和可替宁的含量，通过计算不同保存时间的降解率来判断样本处理液中待测物的稳定性。结果显示，样品处理液中待测物在 24 h 内浓度无明显变化，降解率 < 3%。因此，样品处理液在室温下可保存 1 d。

2.7　实际样本分析(图 5)　采用本方法分别测定 6 名烟龄为 1 ~3 年的年轻男性(平均年龄 22 岁)吸入约 0.6 g 尼古丁后，随不同时间点尼古丁和可替宁的浓度变化。采集其 1、2、3、4、6、8、12、16、24 h 后的尿液，按 1.3.2 节中“样本预处理”项操作，测定各时间点尼古丁和可替宁的浓度。尿液中尼古丁和可替宁的代谢变化趋势见图 5。如图，尽管尼古丁在体内经细胞色素氧化酶 CYP2A6 代谢转化为可替宁，但仍有部分以原型形式从尿液中排出。当吸烟 1 h 后，尼古丁在尿液中的平均浓度达到最大值(115.9 μg/mL)，经 16 h 后能基本代谢完全。可替宁在吸烟 2 h 后平均浓度出现了最大值(160.2 μg/mL)，尿液中的可替宁经 16 h 后也基本能排泄完全。

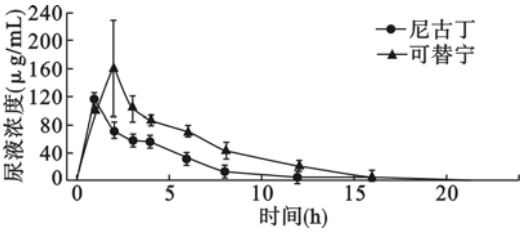


图 5　受试者吸入尼古丁后尿液中尼古丁和可替宁的代谢动力学每个点以 $x \pm s$ 表示(n =6)

3　讨　论

据近年国际国内的研究调查表明，吸烟已成为危害人类健康的第一杀手[8]。目前，检测生物体液中尼古丁和可替宁的方法主要有气相色谱法[9-10]、气质联用法[11-13]、液质联用法[14-20]等。与质谱仪器昂贵，对操作人员要求高，检测成本高相比，气相色谱更易成为检测生物体液中烟草含量的常规方法。采用气相色谱分析样本时，样本基质对目标化合物的保留和分离有很大的干扰，从而影响定量分析。以往的研究中，生物体液样本预处理主要采用消解法[9-10]，蛋白沉淀法[9,21]和固相萃取法[19,22]。消解法操作繁琐，操作时间较长。蛋白沉淀法操作虽简单，但净化效果较差，基质干扰较大。固相萃取法净化效果和重现性虽较好，但过程相对繁琐(包括柱活化、上样、淋洗、洗脱)，操作时间和溶剂用量消耗均较大。QuEChERS 方法是近年来由 Anastassiades 等[23]发展起的一种新的样本预处理技术，该方法主要包括提取和净化 2 个步骤。QuEChERS 方法操作简单、快速、成本低，且净化效果好，目前已在食品基质农残检测领域获得广泛应用。但 QuEChERS 方法在生物体液(如尿液)基质预处理的应用上目前还很少。

本研究通过对 QuEChERS 预处理方法中提取剂和净化剂的优化，探索出适用于尿液中尼古丁和可替宁浓度的同时检测分析方法。所选择的萃取剂(乙腈)与之前固相萃取方法相比[19,22]，大大降低了有机试剂的用量，更环保、更安全。采用正交试验探究出最适宜的吸附条件，较已有预处理方法，大大降低了基质的干扰，更利于气相色谱的分析测定；通过升温模式和色谱条件的优化，较之前文献报道的方法[9-20]缩短了分析时间，使检测更快速；且该方法的准确度、精密度和回收率均能满足检测的需要。将该方法用于暴露者的烟草暴露剂量评估和代谢动力学研究，发现结果与 Kataoka 等[24]的研究结果基本一致。由此说明，较现有文献报道的方法，本方法在满足同时对尿液中尼古丁与可替宁浓度检测分析的测定条件下，在操作、试剂用量、减少有机试剂污染、降低检测成本等方面上，均具优势。

参考文献

[1] Barker R. Tobacco smoke and involuntary smoking [M]. Lyon, France: IARC Press, 2004: 83.

[2] Wynder EL, Hoffmann D. Tobacco and health: a societal challenge [J]. N Engl JMed, 1979, 300(16): 894 – 903.

[3] 李铁威, 马洁, 赵鹏飞. 尼古丁与肺癌的关系研究进展[J]. 绿色科技, 2013, 7: 313 – 315.

[4] 王军, 吴彬, 曹艳, 等. 尼古丁对 PDLFs 细胞 MAPKs 信号通路影响[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(5): 616 – 619.

[5] Bramer SL, Kallungal BA. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker [J]. Biomarkers, 2003, 8(3 – 4): 187 – 203.

[6] Dimich-Ward H, Gre H, Brauer M, et al. Analysis of nicotine and cotinine in the hair of hospitality workers exposed to environmental tobacco smoke [J]. J Occup Environ Med, 1997, 39(10): 946 – 948.

[7] SRNT Subcommittee on Biochemical Verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation [J]. Nicotine Tob Res, 2002, 4(2): 149 – 159.

[8] 曹长霞. 吸烟危害健康临床分析[J]. 职业与健康, 2001, 17(8): 112 – 113.

[9] 朱琳, 杨丽君, 孙丽艳. 尿液和头发中尼古丁和可替宁的毛细管气相色谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(7): 626 – 628.

[10] 谷素英, 黎源倩, 刘驰青, 等. 毛细管气相色谱法测定头发中尼古丁及其代谢产物可的宁[J]. 四川大学学报医学版, 2008, 39(1): 133 – 136.

[11] Mozaner BDC, Alves MN, Cabrices OG, et al. A rapid assay for the simultaneous determination of nicotine, cocaine and metabolites in meconium using disposable pipette extraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [J]. J Anal Toxicol, 2014, 38(1): 31 – 38.

[12] Iwai M, Ogawa T, Hattori H, et al. Simple and rapid assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using micro-extraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry[J]. Nagoya J Med Sci, 2013, 75(3 – 4): 255 – 261.

[13] Man CN, Gam LH, Ismail S, et al. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2006, 844(2): 322 – 327.

[14] Moyer TP, Charlson JR, Enger RJ, et al. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles [J]. Clin Chem, 2002, 48(9): 1460 – 1471.

[15] Meger M, Meger-Kossien I, Schuler-Metz A, et al. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2002, 778(1 – 2): 251 – 261.

[16] Hoofnagle AN, Laha TJ, Rainey PM, et al. Specific detection of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Am J Clin Pathol, 2006, 126(6): 880 – 887.

[17] Xu X, Iba MM, Weisel CP. Simultaneous and sensitive measurement of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chem, 2004, 50(12): 2323 – 2330.

[18] Chadwick CA, Keevil B. Measurement of cotinine in urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Annb Clin Biochem, 2007, 44(Pt 5): 455 – 462.

[19] Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3′-hydroxycotinine, nornicotine and norcotinine in human meconium by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2008, 863: 107 – 114.

[20] Pellegrini M, Marchei E, Rossi S, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry assay for determination of nicotine and metabolites, caffeine and arecoline in breast milk [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(16): 2693 – 2703.

[21] Jacob P, Yu L, Duan M, et al. Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3′-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(3 – 4): 267 – 276.

[22] da Fonseca BM, Moreno IE, Magalhães AR, et al. Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2012, 889 – 890: 116 – 122.

[23] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412 – 431.

[24] Kataoka H, Inoue R, Yagi K, et al. Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 49(1): 108 – 114.

收稿日期: 2016-07-20　（吴少慧编辑　周欣琳校对）