

水环境中人口标记物可替宁含量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of population marker cotinine in water environment
with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2021 - 11 - 09 发布

2022 - 01 - 09 实施

目 次

前言..... III

1 范围 1

2 规范性引用文件..... 1

3 定义 1

4 方法原理 1

5 试剂和材料..... 1

6 仪器和设备..... 2

7 样品制备和保存..... 3

8 分析步骤..... 3

9 结果计算与表示..... 6

10 方法检出限和定量限 6

附录 A（资料性） 可替宁(Cotinine）及其氘代内标的 MRM 色谱图..... 7

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。

本文件由湖南省市场监督管理局提出并归口。

本文件起草单位：湖南省产商品质量检验研究院和湖南省毒品检验分析室（长沙市公安局毒品检验鉴定中心）。

本文件主要起草人：刘红梅、肖蓉、李欣、张旭东、陆世雄、钱荣敬、张蕾、唐超群、陈实、叶小兰、李志丰。

水环境中人口标记物可替宁含量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水环境样品中可替宁的测定方法。

本文件适用于水环境样品中可替宁含量的测定。

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 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

HJ/T 91.1 污水监测技术规范

DB43/T 2199 水环境中 12 种毒品及其代谢物、人口标记物检验方法总则

3 定义

3.1

水环境 water environment

水环境是指自然界中水的形成、分布和转化所处空间的环境，是指围绕人群空间及可直接或间接影响人类生活和发展的水体，其正常功能的各种自然因素和有关的社会因素的总体。本文件中的水环境指的是生活污水、工业废水和自然水体（地表水和地下水）。

3.2

人口标记物 population marker

人口标记物是经过人类身体代谢产生和排出体外的物质，在污水流行病学中，它能够用于服务人口数的估算。

4 方法原理

向样品中添加同位素内标，样品中的毒品及其代谢物经离线或在线固相萃取柱富集，采用液相色谱-串联质谱法进行检测，以保留时间（ t_R ）和质谱特征碎片离子进行定性分析，同位素内标法进行定量分析。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 通用要求

实验用水符合 GB/T 6682 相关规范，除非另有说明，所用试剂均为分析纯试剂。本标准中所用试剂

和溶液的配制，在未注明规格和配制方法时，均应按 GB/T 603 之规定执行。

5.1.2 可替宁标准溶液 ($\rho=1\text{ mg/mL}$): 可用标准物质配制或直接购买有证标准溶液，使用标准物质配制时应根据标准物质的纯度和盐型进行换算，于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为1年。

5.1.3 可替宁标准储备溶液 ($\rho=10\text{ mg/L}$): 将可替宁的标准溶液用甲醇稀释，配制成浓度为 10 mg/L 的标准储备溶液。于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为6个月，使用时应恢复至室温，并摇匀。

5.1.4 可替宁氘代内标标准溶液 ($\rho=0.1\text{ mg/mL}$): 可用标准物质配制或直接购买有证标准溶液，使用标准物质配制时应根据标准物质的纯度和盐型进行换算，于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为1年。

5.1.5 可替宁氘代内标储备溶液 ($\rho=1\text{ mg/L}$): 将可替宁的氘代内标标准溶液用甲醇稀释，配制成浓度为 1 mg/L 的氘代内标储备溶液，于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为6个月，使用时应恢复至室温，并摇匀。

5.1.6 可替宁氘代内标使用液① ($\rho=400\text{ }\mu\text{g/L}$): 将可替宁氘代内标储备溶液用甲醇稀释，配制成浓度为 $400\text{ }\mu\text{g/L}$ 的氘代内标使用液，于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为1个月，使用时应恢复至室温，并摇匀。

5.1.7 可替宁氘代内标使用液② ($\rho=4\text{ }\mu\text{g/L}$): 将可替宁氘代内标储备溶液用甲醇稀释，配制成浓度为 $4\text{ }\mu\text{g/L}$ 的氘代内标使用液，于 $0\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光、密封保存，有效期为1个月，使用时应恢复至室温，并摇匀。

5.1.8 甲醇：质谱级。

5.1.9 乙腈：质谱级。

5.1.10 浓盐酸：优级纯。

5.1.11 甲酸：质谱级。

5.1.12 5%氨水甲醇溶液：将浓氨水与甲醇（5.1.8）以5:95的体积比混匀。

5.1.13 10%甲醇溶液：将甲醇（5.1.8）与水以1:9的体积比混匀。

5.1.14 0.1%甲酸水溶液：将甲酸（5.1.11）和水以1:999的体积比混匀。

5.1.15 磷酸盐缓冲溶液：称取 3.024 g 磷酸二氢钾和 4.053 g 磷酸氢二钾，到 20 mL 水中，混匀， $0\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5.1.16 5%甲醇溶液：将甲醇（5.1.8）与水以5:95的体积比混匀。

5.1.17 甲酸-甲醇溶液：将 500 mL 甲醇（5.1.8）与 500 mL 水混合，同时加入 1 mL 甲酸（5.1.11），混匀。

5.1.18 异丙醇+乙腈（1+1）：将异丙醇和乙腈（5.1.9）以1:1的体积比混匀。

5.1.19 氮气：纯度 $\geq 99.99\%$ 。

5.2 材料

5.2.1 色谱柱：C18 反相高效液相色谱柱 $3.0\text{ mm}\times 150\text{ mm}$, $2.7\text{ }\mu\text{m}$ 或其他等效柱。

5.2.2 固相萃取柱：离线方法固相萃取柱参考型号为 MCX $3\text{ cc}/60\text{ mg}$ 或等效柱，在线方法的参考型号为 HLB Direct Connect HP ($2.1\text{ mm I.D.}\times 30\text{ mm L.}$, $20\text{ }\mu\text{m}$) 或等效柱。

5.2.3 水系滤膜：粒径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 或 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 。

5.2.4 有机系滤膜：粒径 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 。

6 仪器和设备

6.1 抽滤装置。

6.2 固相萃取装置。

6.3 氮吹浓缩或者真空离心浓缩装置。

6.4 液相色谱-三重四级杆串联质谱仪（若采用在线固相萃取方法应配备在线 SPE 大体积进样分析系统）。

7 样品制备和保存

7.1 样品保存

若采集的样品 pH 不小于 2，则应加入浓盐酸调节 pH 至小于 2。若样品在 3 天内进行前处理，则将样品于 0℃~4℃条件下保存，若保存时间超过 3 天，则将样品冷冻保存，且在 1 个月内完成分析。离线固相萃取方法中，萃取浓缩后的试样若不能及时分析，应于 0℃~4℃避光、密封保存，并在 3 天内完成分析。

7.2 样品制备

7.2.1 离线固相萃取法

将待测样品恢复至室温，充分混匀。使用水系滤膜过滤，移取滤液 50 mL，加入 100 μL 氘代内标使用液①（5.1.6），混匀后进行固相萃取，固相萃取参数见下表 1，萃取完成后将洗脱液置于浓缩装置中 40℃浓缩至近干，用 10%甲醇溶液（5.1.13）200 μL 复溶，过 0.22 μm 有机滤膜，待测。以实验用水为空白样品，空白样品与样品同时、同步骤处理。

表 1 固相萃取条件参数

序号	步骤	溶剂	体积(mL)	流速(mL/min)
1	活化	甲醇	4	3
2	活化	水	4	3
3	上样	/	50	1
4	淋洗	甲醇	4	2
5	洗脱	5%氨水甲醇	4	2

7.2.2 在线固相萃取法

将待测样品恢复至室温，充分混匀。过水系滤膜，移取 10 mL 过滤后水样，加入 0.5 mL 磷酸缓冲溶液（5.1.15），混匀，准确移取 0.9 mL 混匀水样，加入 4 μg/L 的氘代内标溶液（5.1.7）100 μL，混匀后经 0.22 μm 有机滤膜过滤，置于样品瓶中，待测。以实验用水为空白样品，空白样品与样品同时、同步骤处理。

8 分析步骤

8.1 仪器检测参考条件

8.1.1 离线固相萃取法仪器参考条件

- a) 柱温：40℃；
- b) 流动相 A 相：0.1%甲酸水溶液；

- c) 流动相 B 相：乙腈；
- d) 流速：0.4 mL/min；
- e) 进样量：5 μ L；
- f) 洗脱：梯度洗脱，梯度洗脱条件见表 2；
- g) 扫描方式：正离子扫描；
- h) 检测方式：多重反应监测；
- i) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- j) 可替宁及其氘代内标的定性、定量离子对和碰撞能量条件见表 3。

表 2 离线固相萃取法梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	95.0	5.0
2.00	95.0	5.0
3.00	85.0	15.0
6.00	45.0	55.0
7.00	15.0	85.0
10.00	15.0	85.0
10.10	0.0	100.0
13.00	0.0	100.0
13.10	95.0	5.0
16.00	95.0	5.0

表 3 可替宁及其氘代内标的定性、定量离子对和碰撞能量条件

序号	目标物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 (V)
1	可替宁	177.1	80.1	28
			98.1	24
2	可替宁-D3	180.1	80.1	40
			101.1	20

注：对于不同的质谱仪器，参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化至最佳。

8.1.2 在线固相萃取法仪器参考条件

- a) 柱温：40 $^{\circ}$ C；
- b) 流动相 A 相：0.1%甲酸水溶液；
- c) 流动相 B 相：乙腈；
- d) 流速：0.4 mL/min；
- e) 洗脱：梯度洗脱，梯度洗脱条件见表 4；
- f) 进样量：400 μ L；
- g) 在线固相萃取条件，萃取液 A：水；萃取液 B：5%甲醇溶液；萃取液 C：甲酸-甲醇溶液；萃取液 D：异丙醇+乙腈（1+1）；在线固相萃取程序见表 5；

- h) 扫描方式：正离子扫描；
- i) 检测方式：多重反应监测；
- j) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- k) 可替宁及其氘代内标的定性、定量离子对和碰撞能量条件见表 3。

表 4 在线固相萃取法梯度洗脱条件

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0.00	95.0	5.0
5.00	95.0	5.0
6.00	85.0	15.0
9.00	45.0	55.0
10.00	15.0	85.0
15.00	15.0	85.0
15.10	0.0	100.0
20.00	0.0	100.0

表 5 在线固相萃取程序

时间（min）	萃取液 A（%）	萃取液 B（%）	萃取液 C（%）	萃取液 D（%）	流速（mL/min）
0.01	0.0	100.0	0.0	0.0	3.0
2.80	0.0	100.0	0.0	0.0	3.0
2.84	0.0	100.0	0.0	0.0	3.0
2.85	0.0	0.0	100.0	0.0	2.0
5.00	0.0	0.0	100.0	0.0	2.0
5.01	0.0	0.0	0.0	100.0	2.0
10.00	0.0	0.0	0.0	100.0	2.0
10.01	100.0	0.0	0.0	0.0	2.0
15.00	100.0	0.0	0.0	0.0	2.0
15.01	100.0	0.0	0.0	0.0	0.5
20.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.5

8.1.3 仪器调试

按照仪器使用说明书在规定时间和频次内对液相色谱-三重四级杆串联质谱仪进行仪器质量数和灵敏度校正，以确保仪器处于最佳测试条件。

8.1.4 标准曲线建立

取与样品等量的实验用水，添加可替宁标准储备溶液(5.1.3)，使得可替宁的浓度为 1 ng/L、5 ng/L、

10 ng/L、50 ng/L、100 ng/L、500 ng/L、1000 ng/L、2500 ng/L、5000 ng/L，作为标准曲线添加样品，与样品平行操作，得到标准曲线溶液，按仪器条件进样分析，记录保留时间和峰面积，建立标准曲线。

8.1.5 试样和空白测定

试样和空白样品按照与绘制标准曲线相同的仪器分析条件进行测定。

9 结果计算与表示

9.1 计算含量

记录标准曲线和样品中目标物与相应氘代内标的保留时间和定量离子对峰面积值，以标准曲线中目标物与相应氘代内标的定量离子对峰面积比为纵坐标、标准曲线中目标物的含量为横坐标进行线性回归，得到线性方程。根据样品中目标物及相应内标的定量离子对峰面积值，按公式（1）计算出样品中目标物的含量。

$$\rho_i = (Y - a) / b \quad (1)$$

式中：

ρ_i ——样品中目标组分 i 的质量浓度，ng/L；

Y ——样品中目标物与相应内标的定量离子对峰面积比；

a ——线性方程的截距；

b ——线性方程的斜率。

9.2 结果表示

当测定结果小于 100 ng/L 时，保留三位有效数字；当测定结果大于或等于 100 ng/L 时，保留整数。

10 方法检出限和定量限

本方法中目标分析物的检出限为 0.3 ng/L，定量限为 1 ng/L。

附 录 A
(资料性)

可替宁(Cotinine)及其氘代内标的 MRM 色谱图

A. 1 离线固相萃取法中可替宁及其氘代内标的 MRM 色谱图

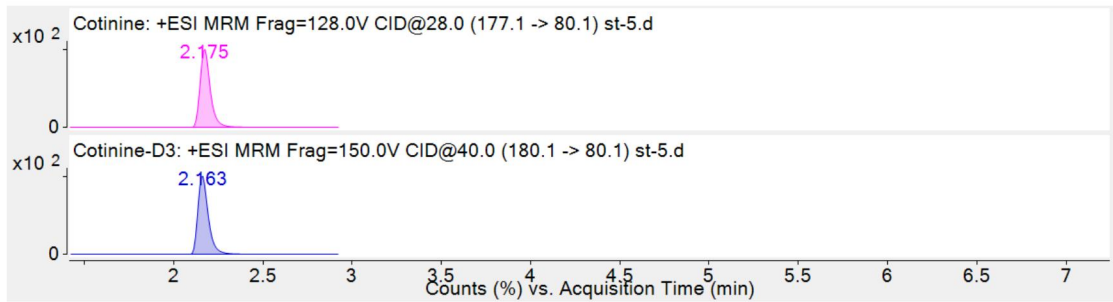


图 A. 1 离线固相萃取法中可替宁及其氘代内标的 MRM 色谱图

A. 2 在线固相萃取法中可替宁及其氘代内标的 MRM 色谱图

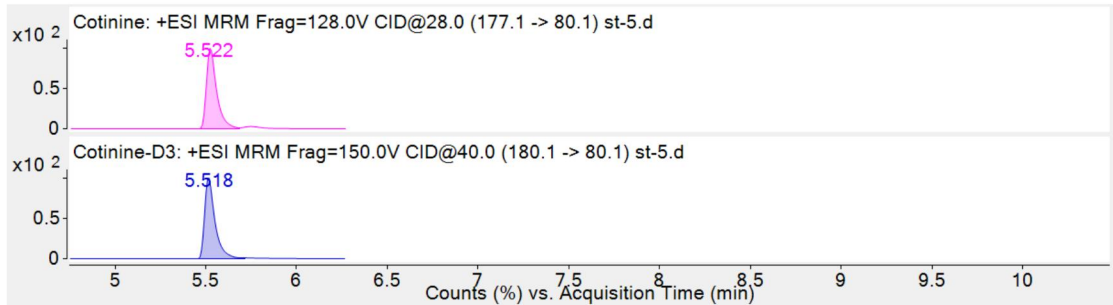


图 A. 2 在线固相萃取法中可替宁及其氘代内标的 MRM 色谱图