



Determination of Cotinine and Trans-3'-Hydroxycotinine in Human Serum by LC-MS/MS and Its Application

Daguang Wang¹, Kehe Du², Lijun Shao², Shiqiao Ma², Xiaofeng Yang¹, Tianyi Liu¹, Qian Liu¹, Meng Wang¹, Hongjun Liu², Yiqun Wu^{2,*}

¹Beijing Hospital Laboratory, National Center for Gerontology, Beijing, China

²Iphase Pharma Laboratory, Iphase Pharma Services (Think Tank Research Center for Health Development Laboratory), Beijing, China

Email address:

13366288061@126.com (Daguang Wang), kdu@iphasepharma.com (Kehe Du), lshao@iphasepharma.com (Lijun Shao), sma@iphasepharma.com (Shiqiao Ma), 13701152964@163.com (Xiaofeng Yang), liutianyi08@sina.com (Tianyi Liu), liuqianbjh@sina.com (Qian Liu), wangmenglj1@163.com (Meng Wang), hliu@iphasepharma.com (Hongjun Liu), wuyq1946@sina.com (Yiqun Wu)

*Corresponding author

To cite this article:

Daguang Wang, Kehe Du, Lijun Shao, Shiqiao Ma, Xiaofeng Yang, Tianyi Liu, Qian Liu, Meng Wang, Hongjun Liu, Yiqun Wu. Determination of Cotinine and Trans-3'-Hydroxycotinine in Human Serum by LC-MS/MS and Its Application. *Asia-Pacific Journal of Health Science*. Vol. 1, No. 1, 2019, pp. 5-13.

Received: March 20, 2019; Accepted: April 25, 2019; Published: April 30, 2019

Abstract: OBJECTIVE: An LC-MS/MS method for determination of Cotinine and Trans-3'-Hydroxycotinine in human serum was developed. Establish a methodology basis for studying tobacco exposure and health. METHOD: After protein precipitation with acetonitrile, the analytes and internal standard (I.S.), Cotinine-d₃, were separated on a ZORBAX SB-Phenyl analytical column using the mobile phase of methanol (containing 0.3% formic acid) and water (containing 0.15% formic acid). Detection was carried out by electrospray positive ionization mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. RESULT: Cotinine, Trans-3'-Hydroxycotinine and I.S. were eluted at 2.56 min, 1.58min and 2.56 min, respectively. The calibration curves were linear and ranges for cotinine, trans-3'-Hydroxycotinine were respectively 0.05-500 ng·mL⁻¹ and 0.50~1250 ng·mL⁻¹. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 0.05 ng·mL⁻¹ for cotinine and 0.50 ng·mL⁻¹ for trans-3'-Hydroxycotinine. Inter- and intra-day relative standard deviations were both less than 11%, and the relative errors were within ±7%. The mean extract recoveries were 98.54% (Cotinine) and 100.24% (trans-3'-Hydroxycotinine). CONCLUSION: It is a rapid, sensitive, selective and reliable method for the determination of cotinine and trans-3'-Hydroxycotinine in human serum in human serum. The cutoff value can be determined by measuring the content of cotinine in human serum, which provides a basis for distinguishing between smoking and non-smoking.

Keywords: Cotinine, Trans-3'-hydroxycotinine, Human Serum, LC-MS/MS, CUTOFF Value

LC-MS/MS法测定人血清中的可替宁和3-羟基可替宁含量及其应用

王大光¹, 杜克贺², 邵立军², 马士巧², 杨晓枫¹, 刘添翼¹, 刘倩¹, 王萌¹, 刘鸿君², 吴宜群^{2*}

¹北京医院检验科国家老年医学中心, 北京, 中国

²北京汇智泰康医药技术有限公司分析部(新探健康发展研究中心医学实验部), 北京, 中国

邮箱

13366288061@126.com (王大光), kdu@iphasepharma.com (杜克贺), lshao@iphasepharma.com (邵立军),

sma@iphasepharma.com (马士巧), 13701152964@163.com (杨晓枫), iutianyi08@sina.com (刘添翼),

liuqianbjh@sina.com (刘倩), wangmenglj1@163.com (王萌), hliu@iphasepharma.com (刘鸿君), wuyq1946@sina.com (吴宜群)

摘要:目的: 建立人血清中可替宁和3-羟基可替宁含量测定方法, 并为深入研究烟草暴露与健康情况奠定方法学基础。方法: 人血清样本以乙腈沉淀蛋白后, 选用ZORBAX SB-Phenyl色谱柱, 以甲醇(含0.3%甲酸)-水(含0.15%甲酸)为流动相进行分离; 选用API5500型三重四级杆串联质谱仪的多重反应监测(MRM)扫描方式进行监测。结果: 可替宁, 3-羟基可替宁和可替宁-d₃同位素内标的保留时间分别为2.56 min, 1.58 min和2.56 min; 血清中可替宁和3-羟基可替宁线性范围为0.05~500 ng·mL⁻¹, 0.50~1250 ng·mL⁻¹。可替宁定量下限为0.05 ng·mL⁻¹, 3-羟基可替宁为0.5 ng·mL⁻¹。日内、日间相对标准差(RSD)均小于11%; 相对偏差(RE)均在±7%的范围以内; 平均提取回收率可替宁为98.54%, 3-羟基可替宁为100.24%。结论: 该方法快速、灵敏高、专属性强、重现性好, 适用于临床人血清中可替宁和3-羟基可替宁的快速检测。通过测定人血清中可替宁的含量可以确定最佳临界值, 为区分吸烟与非吸烟人群提供依据。

关键词: 可替宁, 3-羟基可替宁, 人血清, 液相色谱-串联质谱联用法, 最佳临界值

1. 引言

烟草流行是世界上面临的最大的公共卫生威胁之一, 每年造成700多万人死亡。这些死亡人数超过600万是直接吸烟的结果, 而大约89万人是非吸烟者接触二手烟的结果[1]。因此准确可靠的评价环境烟草烟雾的暴露水平刻不容缓。可替宁是烟草中尼古丁在人体内的主要代谢物, 由于其半减期比尼古丁长且稳定性较好, 是目前评价吸烟暴露水平的最佳生物指标之一[2,3]。目前国内外对生物样本中可替宁和3-羟基可替宁的测定方法有气相色谱[4], 高效液相色谱法[5]、液相色谱-串联质谱联用法(LC-MS/MS)[6-9]等, 但这些方法都存在一定的局限性, 如样本处理过程复杂[6-8], 血清用量较大[7,8], 检测时间较长, 灵敏度低等。本实验拟建立高效、灵敏、准确、专属性强的LC-MS/MS方法, 以测定人血清中可替宁和3-羟基可替宁的含量水平。另外, 由于尼古丁的代谢速率快, 半减期短, 在体内不容易检测到, 受时间限制比较严格, 因此选择尼古丁的代谢产物可替宁和3-OH-可替宁作为检测对象, 既符合烟草中特有成分的代表性, 又能更好的满足检测方面的要求, 保证检测结果的检出率。同时两个代谢物成分的比值, 对于吸烟者成瘾性分析等方面都有很好的参考意义。

吸烟是导致各种心血管疾病和呼吸疾病的重要因素[10], 但是大多数吸烟状况都来自于问卷调查, 由于各种原因吸烟者会隐瞒实际的吸烟习惯[11], 会使这些评估产生误差, 可能会低估实际的患病率。因此, 用烟草中特有成分的代谢产物作为生物标志物来评估吸烟状况更为准确。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

API5500型三重四级杆串联质谱仪: 美国Applied Biosystems公司产品, 配有电喷雾离子化源(ESI)以及Analyst 1.6数据处理软件; Nexera XR液相色谱仪: 日本Shimadzu公司产品, 包括LC-20AD_{XR}型二元泵, DGU-20A_{3R}型脱气机, SIL-20AC_{XR}型自动进样器, CBM-20A系统控制器; VX-2400 Multi-tube Vortexer高速振荡混合器: VWR Scientific; Beckman GPR Centrifuge高速离心机: Beckman。

2.2. 材料

可替宁(纯度为99.8%), Cerilliant, 批号: FN051110-04; 3-羟基可替宁(纯度98.0%), Toronto Research Chemicals Inc, 批号: H924500; 可替宁-d₃(纯度:99.3%), Cerilliant, 批号: FN06101501。甲醇, 乙腈为色谱纯, Burdick&Jackson; 水为超纯水(Milli-Q纯水系统制备), 其它试剂均为分析纯。空白人血清来自于无吸烟史的健康志愿者。

3. 试验方法

3.1. 色谱条件及质谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C₁₈-Phenyl Rapid Resolution柱(75 mm×4.6 mm, 3.5 μm, 美国Agilent公司); 流动相: 甲醇(含0.3%甲酸)(B)-水(含0.15%甲酸)(A); 洗脱方式: 梯度洗脱; 梯度设置: 0.01-1.00 min, 15% B; 1.00-1.01 min, 75% B; 1.01-3.00 min, 98% B; 3.00-4.01 min, 15% B。流速: 0.30 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。

离子源: 电喷雾离子化源; 离子喷射电压: 5500 V; 温度: 550°C; 源内气体1(GS1, N₂)压力: 65 psi; 气体2(GS2, N₂)压力: 65 psi; 气帘气体(高纯N₂)压力: 20 psi; 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测(MRM); 用于定量分析的离子对分别为m/z 177.2→m/z 80.1(可替宁), m/z 193.1→m/z 80.1(3-羟基可替宁)和m/z 180.1→m/z 80.1(可替宁-d₃, 内标), 解簇电压(DP)均为: 64 V, 碰撞能量(CE)分别为: 25 eV, 30 eV, 30 eV; 碰撞气(CAD, N₂)压力: 5 psi; Q1和Q3分辨率均为UNIT。

3.2. 标准溶液, 标准曲线, 质控样本的制备

标准储备液的配制: 精密量取0.50 mL可替宁一级标准储备液, 加入50%甲醇水, 配制成可替宁浓度为100 μg·mL⁻¹的二级标准储备液, 冷冻于-20°C冰箱, 备用。

精确称取3-羟基可替宁标准品5.23 mg于5 mL的容量瓶中, 加入50%甲醇水稀释至刻度, 配制成一级标准储备液; 取用一级储备液适量, 使用50%甲醇水配制成浓度为100 μg·mL⁻¹二级标准储备液, 冷冻于-20°C冰箱, 备用。

质控溶液的配制: 分别取适量可替宁储备液, 用50%甲醇水将可替宁稀释成浓度为20, 1000, 25000 ng·mL⁻¹的质控标准工作溶液, 用于配制血清基质质控样品。

内标溶液的配制：精确量取0.05 mL可替宁-d₃标准储备液，用50%乙腈水溶液配制浓度为50 ng·mL⁻¹的内标工作溶液，于4℃冰箱中保存备用。

标准曲线工作液的配制：取适量可替宁和3-羟基可替宁储备液，用50%甲醇水稀释成浓度分别为0.5、5、10、50、100、250、1250、2500、5000 ng·mL⁻¹和 5、10、50、100、250、1250、6250、12500 ng·mL⁻¹的标准曲线工作溶液。

质控样本的配制：分别取适量可替宁和3-羟基可替宁质控溶液，用空白血清配制含可替宁和3-羟基可替宁浓度分别为0.20, 10.0, 250 ng·mL⁻¹和 10, 125和625 ng·mL⁻¹的质控样本。

3.3. 血清样本处理

取血清100 μL，分别加入内标溶液100 μL，乙腈500 μL，涡旋震荡1 min，13000 rpm离心3 min，取600 μL上清转移至2.0 mL塑料离心管中，80℃水浴氮气吹干，残渣用 150

μL流动相复溶，13000 rpm离心3 min 后，取10 μL进行 LC-MS/MS分析。

4. 试验结果

4.1. 标准曲线和定量下限

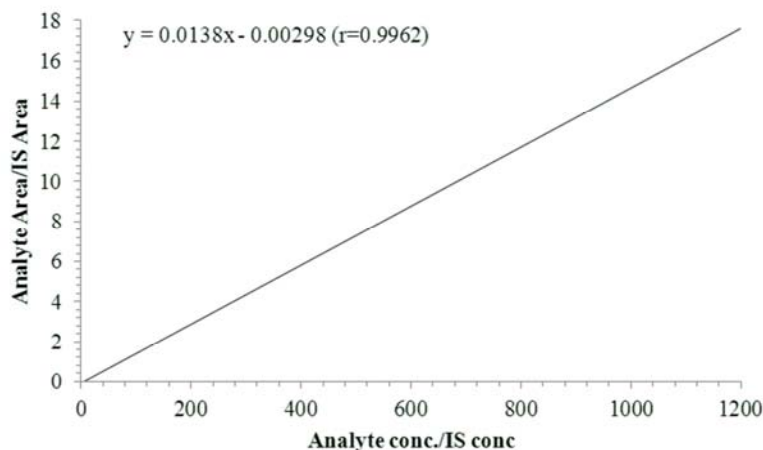
取空白血清100 μL，分别加入可替宁和3-羟基可替宁标准系列溶液10 μL，内标溶液100 μL，沉淀剂乙腈490 μL，其余步骤按2.3项下“血清样本的处理”步骤操作，以血清中待测物浓度为横坐标，待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，用加权 ($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归运算，求得直线回归方程，即为标准工作曲线。每个分析批建立一条标准工作曲线，在间隔三天时间里连续测定5个分析批。结果见表1和2，工作曲线见图1，测定血清中可替宁和3-羟基可替宁的线性范围为0.05~500 ng·mL⁻¹和0.50~1250 ng·mL⁻¹。

表1 人血清可替宁检测标准曲线结果。

批号	可替宁标准曲线系列浓度 (ng/mL)								
	0.05	0.5	1	5	10	25	125	250	500
1	0.049	0.561	1.005	4.884	9.565	25.064	130.324	235.333	482.317
2	0.050	0.514	1.108	4.976	9.266	24.003	128.350	247.390	487.056
3	0.050	0.552	0.958	4.927	10.187	25.057	117.414	257.068	486.356
4	0.051	0.462	0.867	4.821	11.160	26.018	120.330	270.050	515.420
5	0.050	0.495	0.957	4.377	10.224	26.256	129.883	253.556	503.536
Mean	0.050	0.517	0.979	4.797	10.080	25.280	125.260	252.679	494.937
SD	0.001	0.041	0.088	0.242	0.729	0.898	5.967	12.754	14.040
RSD	1.21	7.88	8.97	5.04	7.23	3.55	4.76	5.05	2.84
均值%RE	-0.12	3.37	-2.11	-4.06	0.80	1.12	0.21	1.07	-1.01
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

表2 人血清3-羟基可替宁检测标准曲线结果。

批号	3-羟基可替宁标准曲线系列浓度 (ng/mL)							
	0.5	1	5	10	25	125	625	1250
1	0.542	0.857	4.576	9.246	24.683	136.320	650.300	1376.693
2	0.530	0.897	4.904	9.201	22.925	126.603	686.601	1393.812
3	0.532	0.881	4.861	9.759	24.265	117.814	696.118	1349.997
4	0.481	1.086	4.823	10.204	23.038	110.690	689.970	1320.500
5	0.506	1.004	4.480	9.542	23.391	122.583	667.729	1436.411
Mean	0.518	0.945	4.729	9.590	23.660	122.802	678.144	1375.483
SD	0.025	0.097	0.189	0.412	0.777	9.602	18.830	43.938
RSD%	4.78	10.26	3.99	4.29	3.28	7.82	2.78	3.19
均值%RE	3.63	-5.49	-5.42	-4.10	-5.36	-1.76	8.50	10.04
N	5	5	5	5	5	5	5	5



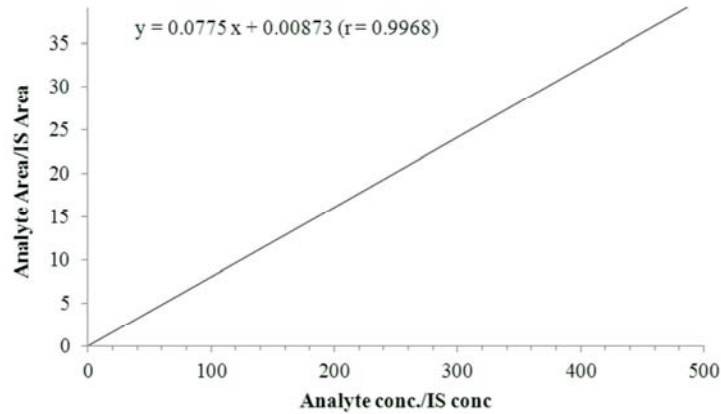


图1 人血清可替宁标准曲线图(上)和3-羟基可替宁标准曲线图(下)。

按“血清样本的处理”项操作, 处理可替宁和3-羟基可替宁浓度为 $0.05 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的LLOQ样本, 以同一分析批的工作曲线计算LLOQ样本的浓度, 根据测定结果计算LLOQ样本的相对误差 (RE)。RE在 $\pm 15\%$ 以内, 因此可替宁定量下限为 $0.05 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 均能达到定量检测的要求。

4.2. 准确度与精密度

按“血清样本的处理”项操作, 处理可替宁和3-羟基可替宁低、中、高3个浓度的QC样本, 以同一分析批的工作曲线计算QC样本的浓度, 根据QC样本的测定结果计算方法的准确度与精密度。结果见表3和表4, RE均在 $\pm 15\%$ 以内, 批内RSD、批间RSD均小于15%。

表3 人血清中可替宁LC-MS/MS测定方法的准确度与精密度结果。

理论浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RE/%	日内RSD/%	日间RSD/%
0.20	0.20 ± 0.01	-0.23	10.94	7.35
10.0	10.15 ± 0.30	1.51	2.33	2.99
250	252.49 ± 6.91	1.00	2.30	2.73

表4 人血清中3-羟基可替宁LC-MS/MS测定方法的准确度与精密度结果。

理论浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定浓度/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	RE/%	日内RSD/%	日间RSD/%
10.0	10.17 ± 0.41	1.74	3.46	4.04
125.0	132.74 ± 7.22	6.19	4.87	5.44
625.0	656.34 ± 19.29	5.01	2.80	2.94

4.3. 提取回收率

按“血清样本的处理”项操作, 处理可替宁和3-羟基可替宁低、中、高3个浓度的QC样本, 取离心后 $600 \mu\text{L}$ 上清至另一干净 2.0 mL 塑料离心管中, 加入50%甲醇水 $20 \mu\text{L}$, 50%乙腈水 $100 \mu\text{L}$, 流动相 $30 \mu\text{L}$, 涡旋混匀后置于进样瓶中, 取 $10 \mu\text{L}$ 进行LC-MS/MS分析, 获得可替宁和3-羟基可替宁的峰面积。同时另取空白血清 $100 \mu\text{L}$, 以等体积的50%乙腈水代替内标溶液, 按“血清样本的处理”项下操作, 取离心后 $600 \mu\text{L}$ 上清至另一干净 2.0 mL 塑料离心管中, 分别加入可替宁和3-羟基可替宁相应浓度溶液 $10 \mu\text{L}$ 、内标溶液 $100 \mu\text{L}$ 、流动相 $30 \mu\text{L}$, 涡旋混匀后置于进样瓶中, 取 $10 \mu\text{L}$ 进行LC-MS/MS分析, 获得可替宁和3-羟基可替宁的峰面积。以每一浓度前种处理方法所得可替宁和3-羟基可替宁的平均峰面积除以后种处理方法所得可替宁和3-羟

基可替宁的平均峰面积, 计算其提取回收率。低、中、高3个浓度血清样品中可替宁的提取回收率分别为102.10%, 91.82%和101.71%, 平均提取回收率为98.54%。3-羟基可替宁的提取回收率分别为97.09%, 106.35%和97.29%, 平均提取回收率为100.24%。

4.4. 特异性

取空白血清 $100 \mu\text{L}$, 以等体积的50%乙腈水代替内标溶液, 按“血清样本的处理”项操作得色谱图2; 将可替宁和3-羟基可替宁及可替宁- d_3 内标加入空白血清样本中, 按“血清样本的处理”项操作得色谱图3; 取实际血清样本, 按“血清样本的处理”项操作得色谱图4。结果表明, 空白血清中的内源性物质不干扰可替宁和3-羟基可替宁和内标的测定, 方法具有良好的特异性。

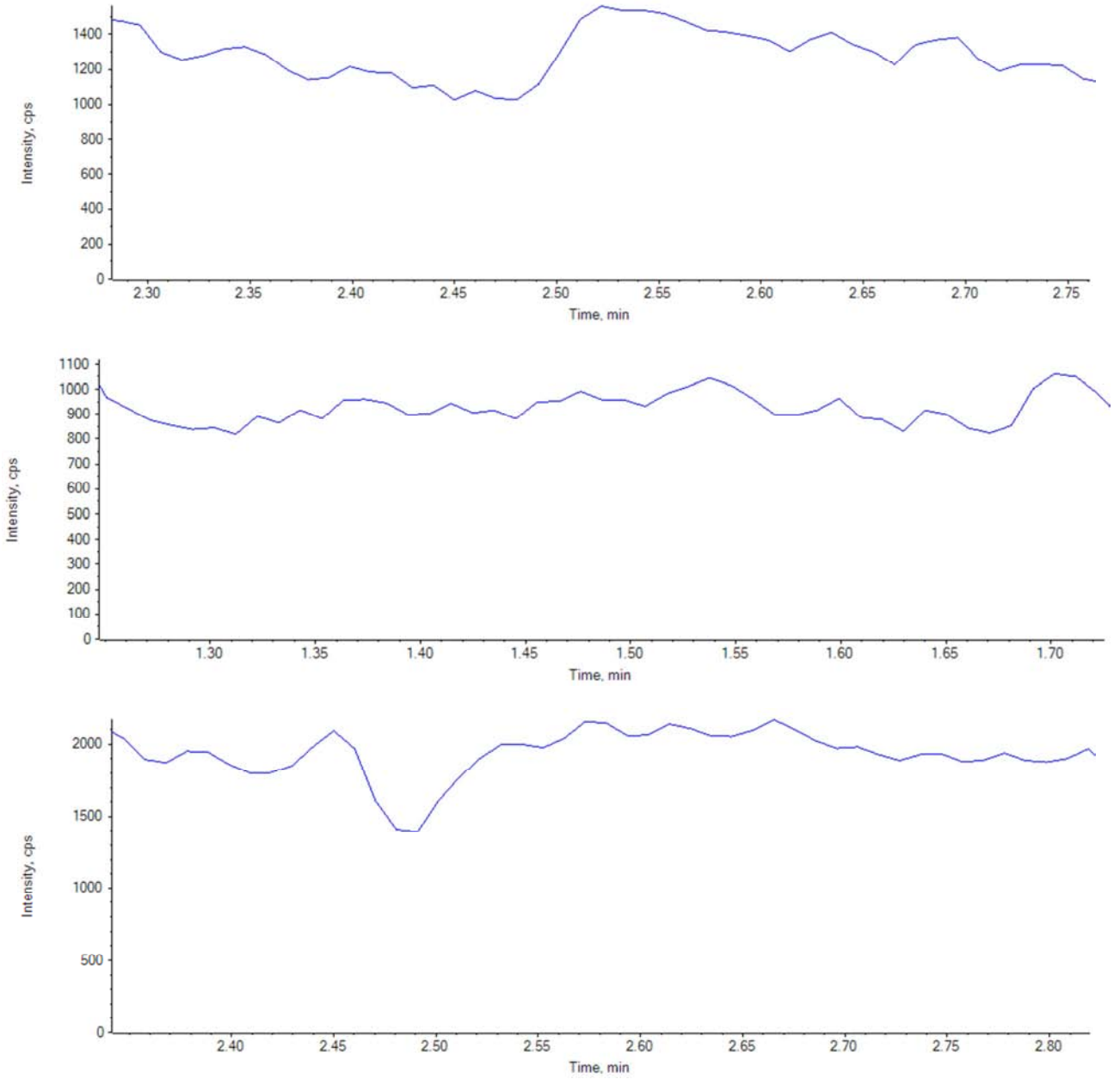
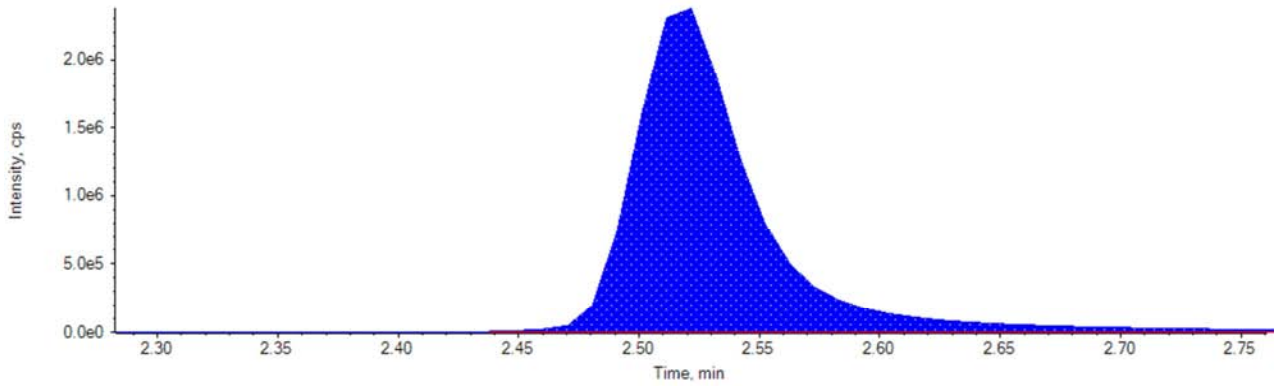


图2 人空白血清可替宁色谱质谱图 (上)、3-羟基可替宁色谱质谱图 (中)及内标色谱质谱图 (下)。



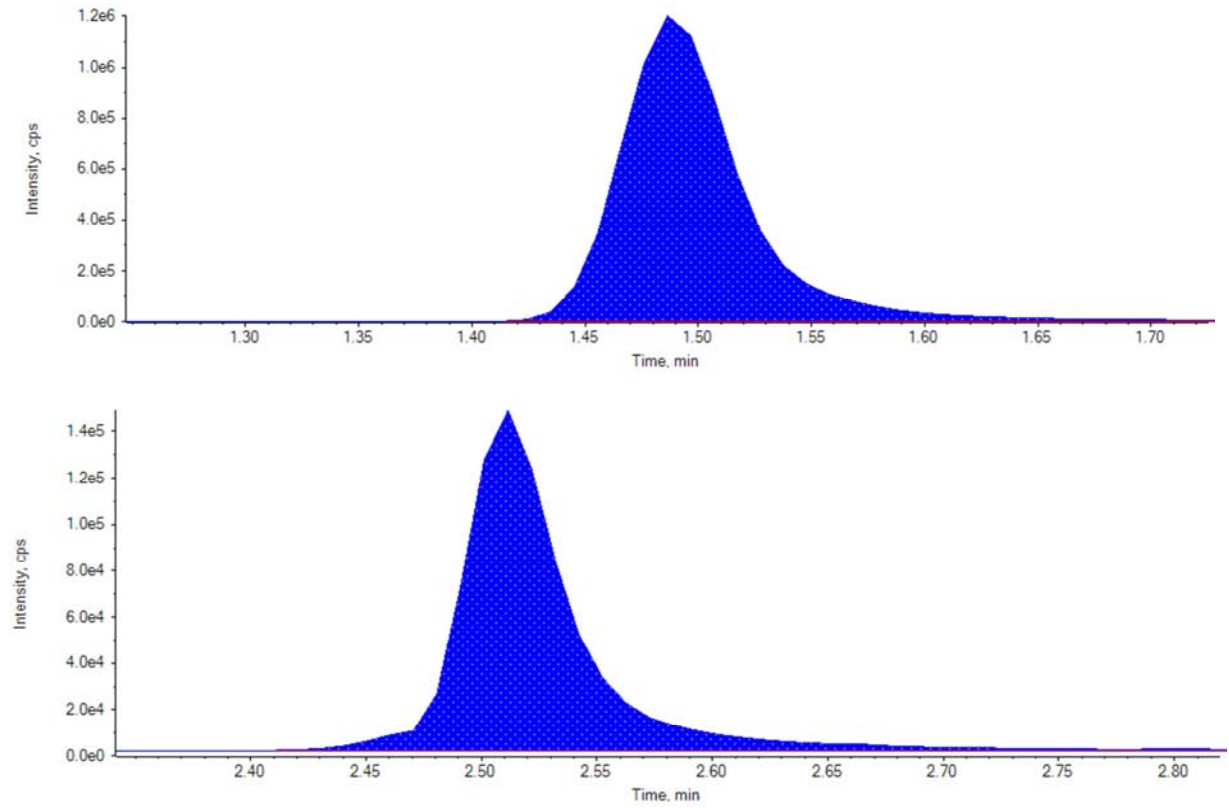
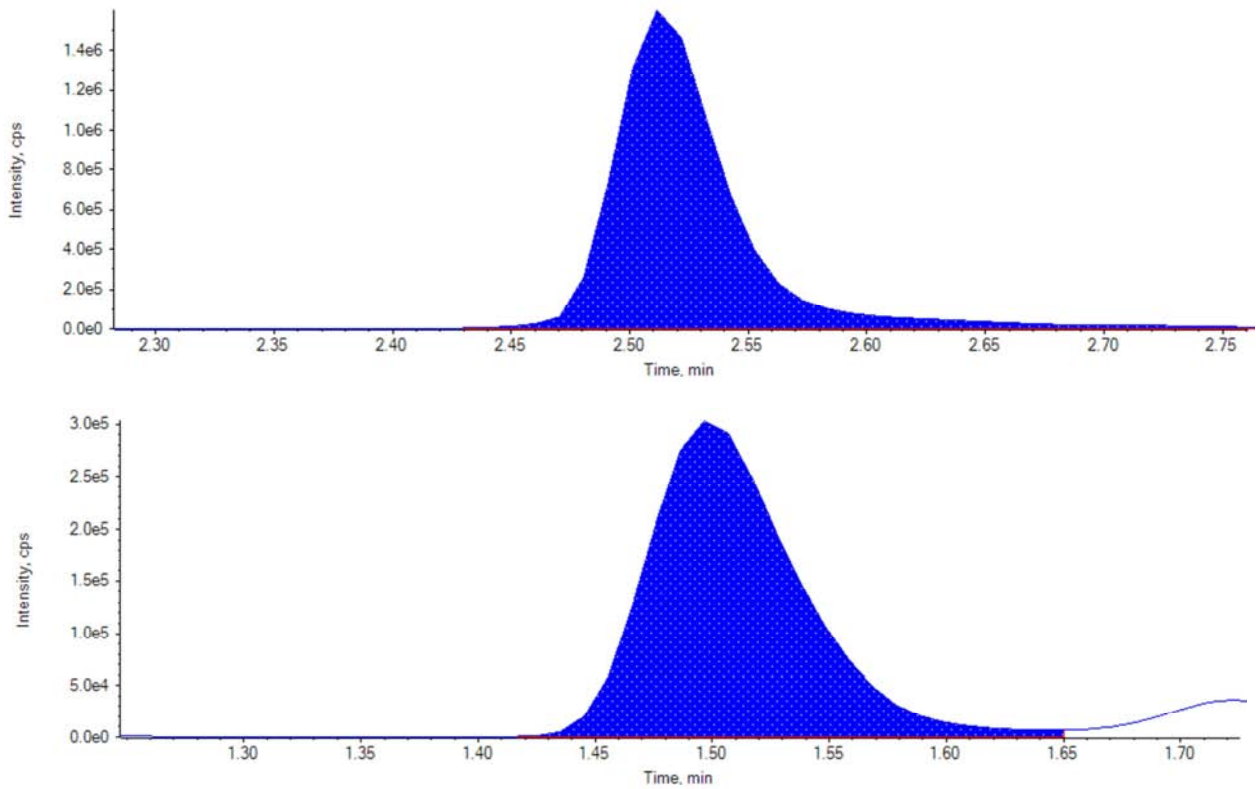


图3 空白血清样本加入可替宁标准溶液 (上)、加入3-羟基可替宁标准溶液 (中)及内标溶液色谱质谱图 (下)。



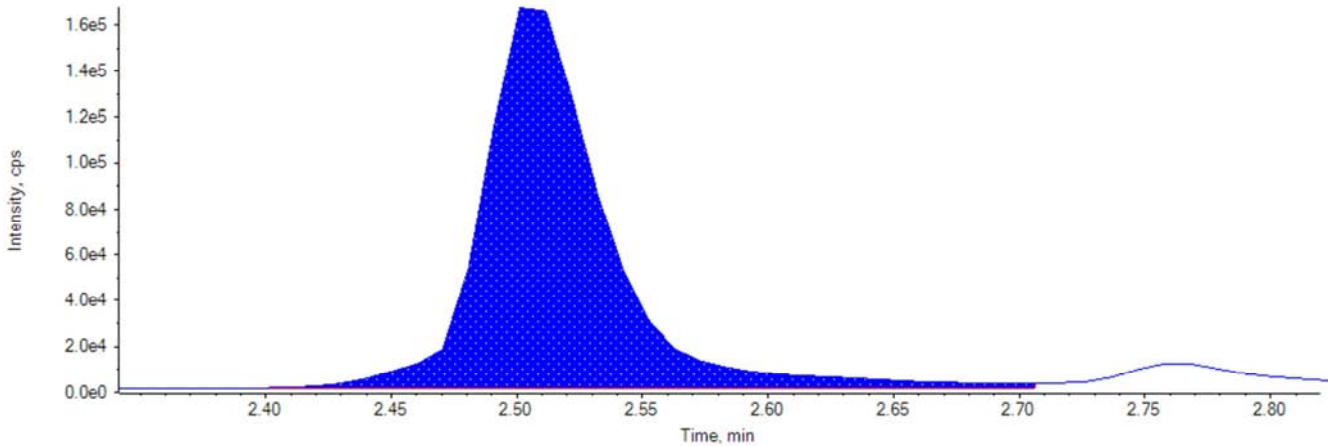


图4 血清样本可替宁色谱质谱图(上)、3-羟基可替宁色谱质谱图(中)及内标色谱质谱图(下)。

5. 检测方法在临床样品检测中的应用

5.1. 试验人群信息

参与调查的人群应符合以下条件：1)年龄在60岁以上，性别不限；2)半年内无酮症或其他应激情况；3)半年内未参加过药物或者临床试验。

有以下情况者应予以排除：1)肝、肾功能不良(血肌酐>正常上限1.2倍，ALT>正常上限2倍)；2)怀孕或哺乳期的妇女；3)进展性的致命性疾病；4)酗酒或滥用药物史；5)有精神疾病正在接受治疗；6)肿瘤放疗化疗患者；7)急性慢性传染病患者。

与问卷匹配的人数785人，其中吸烟140人，不吸烟645人，吸烟率为17.8%。男性433人，其中吸烟133人，不吸

烟300人，吸烟率为30.7%，女性351人，其中吸烟7人，不吸烟344人，吸烟率为1.99%。

5.2. 标本采集并收集相关信息

研究开始和结束时，分两次采集抽样人群空腹静脉血，每次20 ml，分离血清，-80℃冻存，干冰运输。同时，用统一方法进行身高、体重、血压、腹围等体格检查，以及生活方式问卷调查。

5.3. 可替宁和3-OH可替宁含量的测定

应用建立好的LC-MS/MS方法对临床样品进行检测，并对测定结果进行分析。涉及由北京医院生物样本库随机提供的785份临床血清样本可替宁和3-羟基可替宁含量测定。

表5 可替宁和3-羟基可替宁测定结果统计。

可替宁	浓度范围 ng/mL	(0,0.05]	(0.05,2.5]	(2.5,5]	(5,50]	(50,100]	(100,1000]
人数		9	605	14	47	22	88
3-羟基可替宁	浓度范围 ng/mL	(0,0.5]	(0.5,1]	(2.5,5]	(5,10]	(50,100]	(100,1000]
人数		560	80	10	78	34	23

5.4. 可替宁含量与Cut off值的计算

可替宁是评价吸烟暴露水平的最佳生物指标之一，可替宁含量的测定可以更准确的评估当前吸烟状况和吸烟有关的健康危害。根据吸烟情况绘制ROC曲线见图5、图6和图7，利用“尤登指数”分析得到总人数的最佳界值为2.170 ng/mL(敏感度88.6%，特异性92.1%)，男性的最佳临界值为2.125 ng/mL(敏感度89.5%，特异性88.3%)，女性的最佳临界值为52.655 ng/mL(敏感度71.4%，特异性98.3%)。

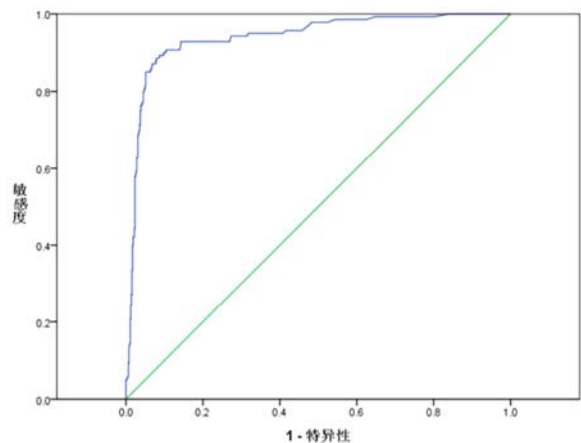


图5 总人数ROC曲线图。

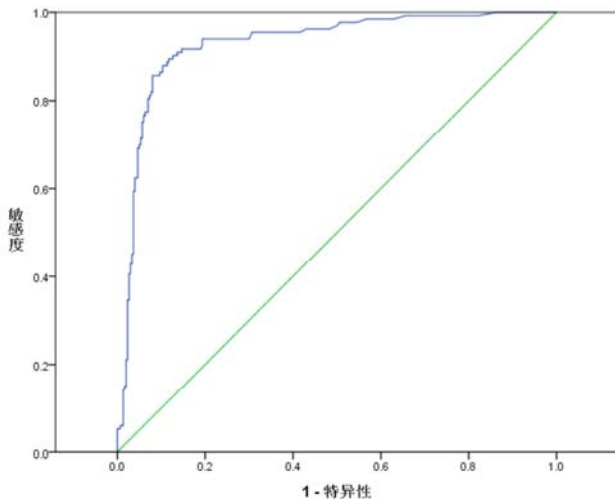


图6 男性ROC曲线图。

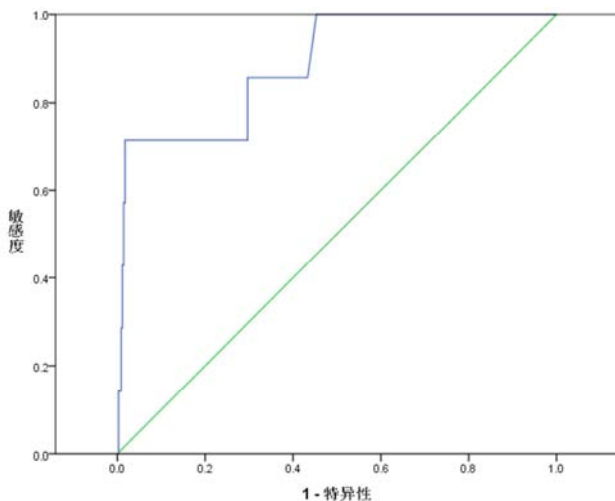


图7 女性ROC曲线图。

以最佳临界值作为是否吸烟的判定标准,总人数的吸烟率为22.3%(可替宁含量低于2.170 ng/mL有610人),男性的吸烟率为35.6%(可替宁含量低于2.125 ng/mL有279人),女性的吸烟率为3.31%(可替宁含量低于52.655 ng/mL有340人),与问卷调查得到的吸烟率相比要高,可能是瞒报或是长时间二手烟暴露所致。

另外,本项目涉及的吸烟女性的数量比较有限,但是也具有一定的统计学意义($n \geq 5$),统计结果能反映出一定的问题,说明本研究采用目前的统计方法是可行的,但是于更加系统的研究要求的考虑,在今后的研究中还需要再扩大样本的数量,以便获得更加客观综合的统计结果。

6. 讨论与结论

本研究建立了测定人血清中可替宁含量的LC-MS/MS分析方法,该方法具有选择性好,灵敏度高,高通量的特点。沉淀蛋白前处理方法简单快速,优化后的色谱条件极大缩短检测时间。每个样本分析时间仅需5 min,提高了工作效率。本方法血清用量仅100 μ L,其中

可替宁最低定量限LLOQ达到了0.05 ng/mL,和之前报道的检测方法相比,有了很大的提高,灵敏度的提升极大提高了临床血清样品中可替宁的检出率,可以作为判断烟草暴露的有效标志物。通过绘制ROC曲线,确定该试验人群吸烟最佳临界值,为准确判定吸烟状态从而预测与吸烟相关的疾病提供依据。

基金项目

本题为卫生行业科研专项基金资助课题—增龄变化与老年人常见临床问题的综合解决路径研究(基金编号201302008)。

参考文献

- [1] World Health organization. Fact sheet 339-Tobacco.[2018-03-09].<http://who.int/zh/newsroom/factsheets/detail/tobacco>.
- [2] 王俊,宋瑞金. 人体内可替宁检测技术研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(12): 1111-1114.
- [3] 葛新,郑频频,傅华. 被动吸烟尼古丁及其代谢产物的暴露评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1840-1842.
- [4] Jaakkola MS, Ma J, Yang G, et al. Determinants of salivary cotinine concentrations in Chinese male smokers[J]. *Prev Med*, 2003, 36: 282-290.
- [5] Page-Sharp M, Hale Tw, Hackett LP, et al. Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2003, 796: 173—180.
- [6] Peyton Jacob III, Lisa Yu, Minjiang Duan, 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]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(3-4): 267-276.
- [7] Chao Yuan, Justin Kosewick, Sihe Wang. A simple, fast, and sensitive method for the measurement of serum nicotine, cotinine, and nornicotine by LC-MS/MS [J]. *J. Sep. Sci.* 2013, 36: 2394-2400.
- [8] Maria Dobrinasa, Eva Choonga, Muriel Noetzlia, et al. Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine and varenicline in human plasma by a sensitive and specific UPLC-tandem mass-spectrometry procedure for a clinical study on smoking cessation [J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879: 3574-3582.
- [9] 杨睿悦,周伟燕,张天娇,等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定血清可替宁 [J]. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(4): 333-338.

- [10] Stead LF, Bergson G, Lancaster T. Physician advice for smoking cessation. Cochrane Database Syst Rev 2008:CD000165.
- [11] Ko K, Kwon M J, Yang S H , et al. Evaluation of Serum Cotinine Cut-Off to Distinguish Smokers From Nonsmokers in the Korean Population[J]. Annals of Laboratory Medicine, 2016, 36(5).