

# 溶剂棒微萃取 - HPLC 法快速测定 常用蔬菜中的痕量尼古丁

杨新磊, 罗明标, 丁健桦

(东华理工学院 应用化学系, 江西 抚州 344000)

**摘要:** 建立了一种以溶剂棒微萃取为样品前处理技术, HPLC/UV 法测定常用蔬菜中痕量尼古丁的方法。系统优化了溶剂棒微萃取条件以及 HPLC 法测定尼古丁的相关参数, 方法的线性范围 0.005 ~ 1 mg/L, 相关系数为 0.999 9; 检出限 0.002 mg/L ( $S/N = 3$ ); 在优化的实验条件下对尼古丁的富集倍数可达 190 倍。样品加标回收率 72% ~ 111% (除黄瓜加标样品为 47%), 相对标准偏差小于 10.0% ( $n = 3$ )。实验证明, 本方法可用于常用蔬菜中痕量尼古丁的有效富集、测定。

**关键词:** 溶剂棒微萃取; 高效液相色谱; 尼古丁; 蔬菜

**中图分类号:** O657.72; R155.54 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)05 - 0714 - 04

## Rapid Determination of Trace Nicotine in Common Vegetables by Solvent Bar Microextraction - HPLC

YANG Xin-lei, LUO Ming-biao, DING Jian-hua

(Department of Applied Chemistry, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

**Abstract:** A method for the determination of trace nicotine in common vegetables by HPLC/UV with solvent bar microextraction (SBME) as sample preparation technique was developed. The operating parameters for SBME and HPLC determination of nicotine were optimized. The nicotine enrichment factor was 190 under optimum conditions. The linear range was 0.005 - 1 mg/L with a correlation coefficient of 0.999 9 and the detection limit was 0.002 mg/L ( $S/N = 3$ ). The recoveries of spiked samples (except for cucumber) ranged from 72% to 111% with a relative standard deviation lower than 10.0%. The proposed method can be applied to the enrichment and determination of trace nicotine in common vegetables satisfactorily.

**Key words:** Solvent bar microextraction; HPLC; Nicotine; Vegetable

尼古丁, 又名烟碱, 是广泛存在于烟草和烟草制品中的一种生物碱, 研究表明: 番茄、茄子、花菜等茄科蔬菜中也含有少量的尼古丁。尼古丁对人体的危害众所周知, 但微量尼古丁的摄入却对人体有一定的益处<sup>[1]</sup>, 因此建立一种快速、准确测定蔬菜中痕量尼古丁的方法不仅有助于开发不同蔬菜对人体的药物和保健价值, 还利于寻找微量尼古丁的来源。

现有文献中关于水果蔬菜中痕量组分测定的报道, 多以液液萃取为样品前处理方法, 过程大都较为复杂、繁琐。本实验以一种新型的样品前处理方法——溶剂棒微萃取 (solvent bar microextraction, SBME)<sup>[2-3]</sup>法代替传统的液液萃取方法处理样品, 该方法通过 1 根多孔聚丙烯中空纤维壁孔来固定萃取剂, 给出相 (样品溶液) 中的尼古丁先被萃取到壁孔内的有机相中, 再被反萃取到中空纤维空腔内的接收相 (酸性水溶液) 中, 一步完成萃取、富集和净化, 降低了有机溶剂的使用, 进一步提高了富集倍数。这种萃取 - 反萃取的过程还有效消除了基体组分对尼古丁测定的干扰。研究证明, SBME 样品前处理技术结合 HPLC/UV 检测<sup>[4-6]</sup>的方法可以快速、准确测定常用蔬菜中痕量尼古丁。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

Waters 600 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Atlantis<sup>®</sup> dC<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm, Waters)

收稿日期: 2006 - 08 - 15; 修回日期: 2006 - 10 - 25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20505003); 江西省自然科学基金资助项目 (0520002)

作者简介: 杨新磊 (1982 -), 男, 安徽六安人, 硕士研究生; 罗明标, 联系人, Tel: 0794 - 8258320, E-mail: mbluo@126.com

公司); TU-1810紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); KQ-50DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

尼古丁标准品(MERK - Schuchardt, 含量大于 98%), Accurel Q3/2聚丙烯中空纤维(Membrana, Wuppertal, Germany, 壁厚 200  $\mu\text{m}$ 、孔径 0.2  $\mu\text{m}$ 、内径 600  $\mu\text{m}$ ), 甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司, HPLC级), 其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次水。

### 1.2 样品的预处理

高水分含量样品: 如西红柿、黄瓜等, 样品匀浆后直接离心 10 min(10 000 r/min), 抽滤, 取滤液进行溶剂棒微萃取。

低水分含量样品: 如茄子、花菜、豆角、辣椒等, 取切碎样品 10 g加入 20 mL二次水提取, 于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中超声 30 min浸出样品成分, 再离心 10 min(10 000 r/min), 抽滤, 取滤液进行溶剂棒微萃取。

### 1.3 溶剂棒微萃取步骤

将中空纤维切成 2.5 cm的小段, 放入乙腈中超声清洗 15 s除去杂质; 晾干后放入有机萃取剂中超声浸泡 10 s以使中空纤维壁孔中注满有机溶剂; 用接收相注满中空纤维空腔后封住两端(约盛 5  $\mu\text{L}$ 接收相), 按图 1放入样品瓶中, 打开磁力搅拌器, 以 1 000 r/min速率开始搅拌, 萃取 50 min后取出, 剪开封住端, 用 25  $\mu\text{L}$  HPLC微量进样器(700  $\mu\text{m}$ , o. d.)抽回接收相, 取 4  $\mu\text{L}$ 直接进样测定。

### 1.4 尼古丁标准贮备液和标准溶液的配制

准确称取 0.100 0 g尼古丁, 以甲醇定容至 100 mL容量瓶, 即得 1 000 g/L尼古丁标准贮备液。实验时分别移取不同体积的标准贮备液用二次水稀释成所需浓度的标准工作液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存待用, 使用期 30 d。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 取尼古丁溶液在 190 ~ 400 nm 范围内扫描, 发现尼古丁在 1 261 nm处有最大吸收, 故选用 261 nm为测定尼古丁的最佳检测波长。

2.1.2 有机改性剂 - 三乙胺的加入 以  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mmol/L) -  $\text{CH}_3\text{OH}$  - 三乙胺(体积比 90 10 0.1, pH 2.5)的磷酸盐缓冲溶液为流动相, 流速为 0.6 mL/min时尼古丁的色谱峰如图 2所示, 三乙胺的加入有效改善了尼古丁色谱峰的拖尾现象, 并且提高了尼古丁测定的灵敏度。

### 2.2 SBME条件的优化

SBME是一种微型化的液液萃取模式, 其原理与传统液液萃取一样, 最大的不同之处在于 SBME是一种非消耗型萃取方法, 有机溶剂用量通常只有几至几十微升, 较之传统液液萃取大大降低了有机溶剂的使用。本实验采用的是一种三相 SBME萃取方式, 通过调节给出相和接收相的 pH, 样品中的尼古丁先以分子形式被萃取到中空纤维壁孔内的有机相中, 再被反萃取到酸性接收相中。

根据液液萃取平衡理论和动力学理论, 影

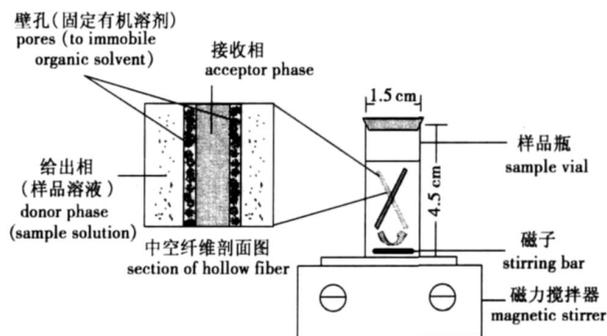


图 1 SBME 萃取装置图  
Fig. 1 Schematic diagram of solvent bar microextraction (SBME)

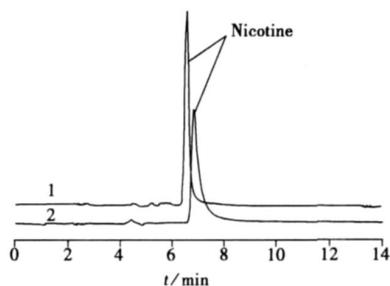


图 2 流动相中三乙胺对尼古丁色谱峰的影响  
Fig. 2 Effect of triethylamine (TEA) in mobile phase on chromatographic peak of nicotine  
1. with TEA (加入三乙胺); 2. without TEA (未加三乙胺)

响萃取效率的主要因素有萃取剂、搅拌速率、萃取时间等。本实验以正辛醇为萃取剂<sup>[7-8]</sup>，2 mL 1 mol/L KOH调节 2 mL 尼古丁标准溶液作为给出相，10 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2)为接收相来反萃取有机溶剂中萃取的尼古丁。搅拌速率和萃取时间对萃取效率的影响分别见图 3(萃取时间为 10 min)和图 4(搅拌速率为 1 000 r/min)。

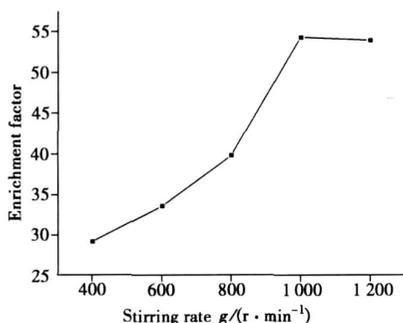


图 3 搅拌速率对萃取效率的影响  
Fig. 3 Effect of stirring rate on the enrichment factor

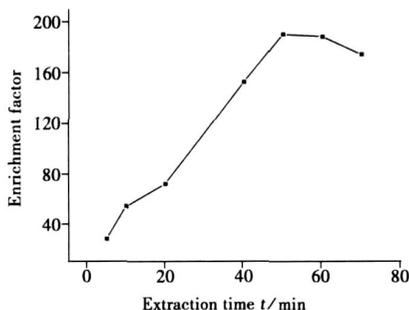


图 4 萃取时间对萃取效率的影响  
Fig. 4 Effect of extraction time on the enrichment factor

从图 3可以看出增加搅拌速率增强了物质的扩散传递，样品中的尼古丁更易进入有机相中，萃取效率持续增加，但当搅拌速率超过 1 000 r/min，萃取过程中会产生气泡附着在中空纤维的外壁上，阻碍了物质的传递，因而萃取效率有所降低。延长萃取时间，萃取更接近平衡，萃取效率越高，但有机溶剂也会随之有所溶解，故萃取效率随时间先升后降。因此，确定搅拌速率为 1 000 r/min，搅拌时间为 50 min。

### 2.3 方法的评价与有效性

以 2 mL 0.100 0 mg/L 尼古丁标准溶液加入 2 mL 1 mol/L KOH 溶液作为给出相，考察方法的富集倍数，按上述实验方法在优化条件下萃取后，取 4  $\mu\text{L}$  接收相进样测定其浓度，将此浓度对比于 0.1 mg/L，即得方法的富集倍数，通过计算得该方法对尼古丁的富集倍数可达 190 倍。

分别取 0.001 000 ~ 10.00 mg/L 范围内的标准溶液 2 mL 按上述方法测定。结果表明，0.005 000 ~ 1.000 mg/L 范围内接收相中的尼古丁峰高值与浓度线性关系良好，相关系数为 0.999 9。

按信噪比  $S/N = 3$  得出该方法对尼古丁的检出限为 0.002 mg/L。

样品加标相对回收率按下式计算： $R = [(h - h_0) / h_s] \times 100\%$ ，式中， $h$  为加标样品尼古丁峰高值， $h_0$  为未加标尼古丁峰高值， $h_s$  加标二次水样尼古丁峰高值。

以西红柿样品为例，从图 5 可以看出：西红柿样品滤液直接进样(色谱峰 3)，由于样品中的尼古丁含量很少，尼古丁峰被基体其他组分峰(6.2 min)掩盖，无法检测；将样品滤液稀释加标后过滤进样(色谱峰 1)，尼古丁峰出现在 6.5 min；

样品滤液经 SBME 后取接收相进样(色谱峰 2)，消除了 6.2 min 时的干扰峰，可以检测出尼古丁峰(6.5 min)。

### 2.4 样品的测定

分别取市售西红柿、茄子、花菜、黄瓜、红辣椒和刚摘的青西红柿按“1.2”处理后，取 2 mL 滤液按前述方法测定。加标实验取 2 mL 样品滤液分别加入 0.010 00 mg/L 和 0.100 0 mg/L 尼古丁，测定结果见表 1。其中，黄瓜(cucumber)样品的加标回收率较低，可能是黄瓜基质对尼古丁有较强的吸附作用，阻碍了萃取的进行。

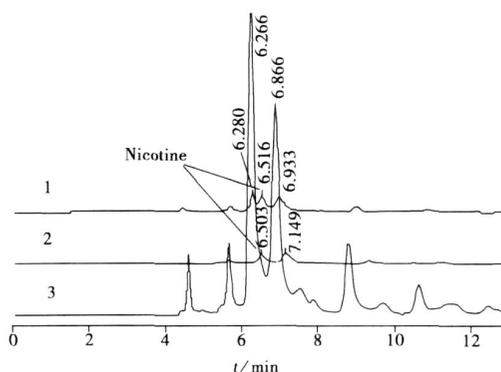


图 5 西红柿滤液不同处理方式的色谱图  
Fig. 5 Chromatograms of tomato filtrate by different treatments

1. spiked tomato filtrate (加标滤液 SBME);
2. filtrate after SBME (滤液经 SBME);
3. directly injected filtrate (4  $\mu\text{L}$ ) (滤液直接进样 (4  $\mu\text{L}$ ))

表 1 样品的测定结果  
Table 1 Determination results of samples

Sample	Nicotine concentration $\pm SD (n=3)$ $w / (ng \cdot g^{-1})$	Relative spiked recovery $R / \% \pm SD (n=3)$		Amount of vegetable required for 1 $\mu g$ of nicotine** $m / g$
		Spiked concentration (0.01 mg/L)	Spiked concentration (0.1 mg/L)	
Green tomato	14.5 $\pm$ 0.52	87.5 $\pm$ 2.98	110.8 $\pm$ 4.32	69.0
Ripe tomato	9.6 $\pm$ 0.67	88.1 $\pm$ 3.70	93.0 $\pm$ 2.51	104.2
Cucumber	-*	88.3 $\pm$ 4.86	47.4 $\pm$ 1.47	
Cauliflower	14.2 $\pm$ 0.080	83.9 $\pm$ 7.97	72.2 $\pm$ 2.09	70.4
Eggplant	11.3 $\pm$ 0.56	77.8 $\pm$ 3.59	89.2 $\pm$ 2.59	88.5
Chili	11.0 $\pm$ 0.55	87.9 $\pm$ 8.53	109.5 $\pm$ 2.08	90.9
Bean	-	98.2 $\pm$ 6.00	90.1 $\pm$ 3.60	

\* - 未检测到 (“-”: not detected); \*\* 人体受尼古丁影响的最小摄入量为 500  $\mu g$  (the minimum quantity of nicotine influencing human body is 500  $\mu g$ )<sup>[9]</sup>

#### 参考文献:

- [1] DOMINO E F, HORNBACH E, DEMANA T. The nicotine content of common vegetables[J]. N Engl J Med, 1993, 329(6): 437 - 449.
- [2] JIANG X, LEE H K. Solvent bar microextraction[J]. Anal Chem, 2004, 76(18): 5591 - 5596.
- [3] CHAI K J, HUANG S D. Analysis of organochlorine pesticides in wine by solvent bar microextraction coupled with gas chromatography with tandem mass spectrometry detection[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(2): 118 - 124.
- [4] 谢笑天, 郑萍, 朱伟明. 高效液相色谱法测定卷烟烟气总粒相中的烟碱[J]. 分析化学, 2000, 28(9): 1085 - 1087.
- [5] CHANG Y L, TSAI P L, CHOU Y C, et al. Simultaneous determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in rat blood and brain tissue using microdialysis coupled with liquid chromatography: Pharmacokinetic application[J]. J Chromatogr, A, 2005, 1088(1-2): 152 - 157.
- [6] 李德亮, 刘锰. 烟碱的色谱测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 108 - 113.
- [7] CHOI K, KM Y, CHUNG D S. Liquid-phase microextraction as an on-line preconcentration method in capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 2004, 76(3): 855 - 858.
- [8] ZHAO L, LEE H K. Liquid-phase microextraction combined with hollow fiber as a sample preparation technique prior to gas chromatography/mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2002, 74(11): 2486 - 2492.
- [9] JARVIS M J. Application of biochemical intake markers to passive smoking measurement and risk estimation[J]. Mutat Res, 1989, 222: 101 - 110.

欢迎订阅 欢迎投稿

《质谱学报》

国内刊号: CN 11 - 2979/TH

国际标准刊号: ISSN 1004 - 2997

邮发代号: 82 - 349

国外发行代号: Q 1717

《质谱学报》(双月刊), 是经国家科委批准, 中国质谱学会、中科院北京科学仪器研制中心主办, 中国原子能科学研究院承办的学术期刊, 中国科学院《核心期刊》之一。

本刊的宗旨是刊登物理、化学、生物化学、材料化学、核科学、地球科学、生命科学等基础学科中质谱法的新理论、新方法、新技术及其在各领域的应用研究成果; 介绍质谱学及其相关技术在上述前沿课题研究中的最新进展; 反映质谱技术广泛应用于农业、石油、地质、药物、化工、临床医学、生物工程、原子能、同位素分析、环境监测、食品质控、材料分析、公安司法、军事部门等国民经济多领域的研究成果。本刊栏目设置有“研究报告”、“研究简报”、“综述”、“讲座”、“技术交流”、“实用信息”等。读者主要对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大中专院校师生。

本刊先后被美国《化学文摘, CA》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国科学引文数据库》、《中国科技论文数据库》、《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库、《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》、《中国期刊全文数据库(CJFD)》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国无机分析化学文摘》、《方正 Apabi 电子期刊》等收录, 并已入网“万方数据 - 数字化期刊群”。本刊介绍网址 <http://www.jcmss.com.cn>

本刊国内外公开发行。大 16 开, 单价: 10.00 元/册, 全年 60 元。请在全国各地邮局订阅。未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。

银行汇款: 帐号: 02000266090088002 - 52, 开户行: 工商银行北京房山支行二六六分理处, 户名: 中国原子能科学研究院

邮局汇款: 北京 275 信箱 65 分箱《质谱学报》编辑部, 邮编 102413。

汇款时请写明汇款用途: 订阅《质谱学报》杂志。

联系电话: 010 - 69357734; E-mail: [jcmss401@163.com](mailto:jcmss401@163.com); 网址: <http://www.jcmss.com.cn>