

纳米磁流体用于三相中空纤维液相微萃取 / HPLC 法对尿液中尼古丁的快速测定

刘 维, 罗明标, 李伯平, 杨 枝, 丁健桦

(东华理工学院 核资源与环境教育部重点实验室, 江西 南昌 330013)

摘要: 首次将磁流体粉末代替磁子, 在磁场作用下, 以三相中空纤维液相微萃取 (three-phase hollow fiber based liquid phase microextraction, TP - HF - LME) 动态模式进行样品前处理, 高效液相色谱 (HPLC) 为检测手段, 建立了一种快速、准确、环境友好的尿中尼古丁含量的测定方法。系统优化了 TP - HF - LME 技术的有机溶剂、磁流体粉末加入量、搅拌速率和萃取时间等条件。方法的线性范围 0.05 ~ 50 mg/L, 相关系数 0.999 8, 检出限为 3 μ g/L ($S/N = 3$), 相对标准偏差小于 3%。该方法用于测定人体尿样中尼古丁, 主动和被动吸烟者尿中尼古丁含量分别为 5.39 mg/L 和 2.08 mg/L, 相对回收率 95% ~ 100%, 富集倍数 17.9 倍。

关键词: 纳米磁流体; 液相微萃取; 高效液相色谱; 尼古丁; 样品前处理; 尿液

中图分类号: O657.72; TS411 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957 (2008) 02 - 0165 - 05

Rapid Determination of Nicotine in Urine with Magnetic Nanoparticle Fluid Based on Three-phase Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction / High Performance Liquid Chromatography

LIU Wei, LUO Ming-biao, LI Bo-ping, YANG Zhi, DING Jian-hua

(Key Laboratory of Nuclear Resources and Environment of Education,
East China Institute of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: A novel method for fast determination of nicotine in urine was established using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a three-phase hollow fiber based liquid phase microextraction (TP - HF - LME) technique for sample preparation. The stirring bar was replaced by magnetic powder, which was introduced for the first time. Parameters related to TP - HF - LME (organic solvent, pH of donor and acceptor phase, the content of magnetic powder, extraction time) were optimized in this study. The proposed method integrated extraction, enrichment and clean-up into a single step and was proven to be a fast, effective, and environment-friendly sample preparation technique, providing a good linear range (0.05 - 50 mg/L) with $r = 0.9998$, a low detection limit (3 μ g/L, $S/N = 3$), and a satisfactory relative standard deviation ($< 3\%$). This method was used to analyse urine samples from active and passive smokers. 5.39 mg/L and 2.08 mg/L of nicotine were detected in active and passive smoker's urine, respectively. The recovery was in the range of 95% - 100%.

Key words: magnetic nanoparticle fluid; LME; HPLC; nicotine; sample preparation technique; urine

尼古丁 (nicotine, 又称烟碱) 是烟草和卷烟中生物碱的主要组成部分, 由于尼古丁有害人体健康, 会引起肺癌等疾病; 而尿液是人体最容易获得的临床检测样品^[1-2], 因此快速准确地测定尿液中尼古丁含量, 不仅可以反映烟叶和烟制品的质量高低^[3-4], 还可为研究尼古丁对人体的影响提供依据。传统的检测方法是通过液液萃取 (LLE)^[5-8]、固相微萃取 (SPE)^[9-12] 等样品前处理后结合气相色谱 - 质谱或高效液相色谱 - 质谱 (GC - MS 或 HPLC - MS) 等进行定量分析, 但是这些方法的样品前处理操作繁琐耗

收稿日期: 2007 - 01 - 14; 修回日期: 2007 - 03 - 13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20505003)

第一作者: 刘 维 (1981 -), 男, 重庆巴南人, 硕士研究生

通讯作者: 罗明标, Tel: 0794 - 8258320, E - mail: mbluo@126.com

时、成本高、需要使用大量对人体和环境有毒或有害的有机溶剂、难以实现自动化,应用受到极大限制。

1999年 Pedersen - Bjergaard等^[13]首次提出以多孔中空纤维为载体的液相微萃取技术(hollow fiber based liquid-phase microextraction, HF - LME),它集采样、萃取和浓缩于一体。不仅具有成本低,装置简单,易与 GC、HPLC、毛细管电泳(CE)联用,较高的富集倍数和回收率等优点;而且还具有突出的样品净化功能。同时有机溶剂用量非常少,是一种环境友好的样品前处理新技术。该技术已经成功地应用于环境和药物分析领域^[14-15],其研究的方向主要集中在新萃取模式及装置,目的在于尽可能提高富集倍数、降低检出限、缩短分析时间。本实验在保持 HF - LME技术优点的基础上对萃取模式进行了改进,利用纳米磁流体粉末和强磁场分别代替磁子搅拌和搅拌器。与文献[15]比较,改进后的萃取技术大大提高了尼古丁在生物体样品中的富集倍数,并且缩短了分析处理时间,具有好的重复性(测定的标准偏差小于 2.68%)和低的检出限(3 μg/L),并将该方法用于实际尿样的测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 600, 配备 UV2487检测器),超越 2000色谱工作站(浙江省科学器材进出口有限责任公司),AccureIQ 3/2聚丙烯中空纤维(Membrana, Wuppertal, 德国;壁厚 200 μm,孔径 0.2 μm,内径 600 μm),尼古丁(纯度大于 98%,MERK - Schuchardt),HPLC级甲醇和丙酮(天津科密欧化学试剂开发中心),其它试剂均为分析纯,实验用水均为二次水。按文献[16]水解法制备强磁性 Fe₃O₄粉末,微粒直径 200~400 nm。

1.2 样品处理

用干燥洁净的聚乙烯塑料瓶收集男性清晨尿液。共 4种尿样:每天吸烟大于 10支的男性(1#样品),每天吸烟小于 10支的男性(2#样品),被动吸烟者(3#样品),不吸烟且极少暴露在吸烟环境下的男性作为空白(4#样品),其中 1#、2#的烟龄 5年以上。样品在 -20℃下密封保存,直至色谱分析^[12]。

1.3 色谱条件

Atlantis dC₁₈(5 μm, 250 mm ×4.6 mm i.d.)色谱柱;流动相:10 mmol/L KH₂PO₄ - 甲醇 - 三乙胺(体积比 90:10:0.1),以 H₃PO₄调 pH 2.5;流速:0.6 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:室温(25℃);进样量:4 μL。

1.4 尼古丁标准储备液与标准溶液的配制

1 g/L尼古丁标准储备液:准确称取 100.0 mg尼古丁用甲醇定容至 100 mL容量瓶, -4℃保存待用。

标准溶液:分别从上述 1 g/L尼古丁标准储备液中移取 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 mL,用二次水定容至 50 mL,配成 1、2、5、10、20、40、100、200、500 mg/L的标准溶液;0.1、0.05、0.01 mg/L的标准溶液由二次水稀释 10 mg/L标准溶液配制所得。

1.5 萃取步骤

本实验采用一种动态三相中空纤维式萃取模型。具体操作步骤如下:首先将中空纤维切成 2.3~2.5 cm的小段,放入丙酮中超声清洗 15 s除去杂质;晾干后取一段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,再将其套在 25 μL微量进样器(已吸入 20 μL接收相)针尖,推出接收相,两端分别用热钳子封住,使中空纤维的有效长度保持 2 cm(约盛 5 μL接收相);按图 1将中空纤维置于样品瓶,固定样品瓶于交变磁场,样品瓶中每次加入 0.25 g磁流体粉末,萃取一定时间后取出,剪开封住的一端,套在 25 μL微量进样器针尖,再剪开另一端,抽回接收相,取 4 μL进行高效液相色谱(HPLC)测定。

2 结果与讨论

2.1 萃取条件的选择

2.1.1 有机溶剂的选择 三相液相微萃取所用的有机溶剂除了要求对目标分析物有合适的溶解度外

(溶解度太小不易将目标分析物从给出相中萃取到有机相, 溶解度太大不易把有机相中的目标分析物反萃取到接收相中去)^[17], 还要求其能与聚丙烯中空纤维有良好的兼容性(能稳定地固定在中空纤维壁孔内), 在水中溶解度低且不易挥发。综合以上因素, 本实验对比了正辛醇、磷酸三丁酯(TBP)、三正辛胺(TOA)和乙酸乙酯 4 种有机溶剂对尼古丁的萃取效率, 结果表明正辛醇作为有机萃取剂对尼古丁的萃取效果最好, 其次是乙酸乙酯、TBP、TOA 最差, 本文选用正辛醇作为有机萃取剂。

2.1.2 磁流体粉末的加入量 因为磁流体粉末可以形成流体, 直接与目标分析物作用, 更有利于萃取。实验分别加入 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.4、0.5、1 g 粉末来考察加入量对萃取效率的影响。从图 2 可以看出, 加入量在 0.15~0.4 g 之间富集倍数无明显变化。但是加入量不能太少, 太少不能使整个溶液体系快速旋转, 不利于分子传递; 太多则会使得整个溶液体系粘度增大, 不利于分子传递。实验选择最佳值 0.25 g。

2.1.3 给出相与接收相组成 尼古丁是一种二元碱性物质, 所以在碱性溶液中尼古丁以分子形式存在, 溶解度相对较小, 更利于被有机溶剂萃取。为此实验选择 2 mL 0.05 mol/L KOH 和 2 mL 20 mg/L 尼古丁标准溶液作为给出相, 采用 pH 3 的 10 mmol/L KH_2PO_4 缓冲液作为接收相(因为 pH 3 既能完全质子化尼古丁又不会对有机萃取剂产生影响)^[15, 18]。

2.1.4 盐效应与接收相中甲醇含量 根据前期实验工作和文献[15, 19], 盐效应和甲醇的加入使尼古丁的萃取效率略有降低, 所以本实验给出相中不加入盐, 接收相中不加入甲醇。

2.1.5 搅动速率及萃取时间 增加搅动速率可以提高目标分析物在给出相中的传质速率, 有利于目标分析物通过有机相进入接收相, 缩短萃取时间。将磁流体粉末代替磁子搅拌, 会形成磁流体与目标分析物的分子间直接作用, 克服了磁子搅拌时因为速率太高产生气泡附着在中空纤维的外壁影响传质的不利因素。实验选择最大转速 1 500 r/min。

液相微萃取是基于传质和萃取平衡两方面因素的一种萃取过程, 受时间因素影响大, 时间越长萃取越接近平衡, 萃取率越高, 但随着时间的延长有机溶剂的溶解和挥发又会对萃取产生负效果。如图 3 中曲线 1 和 2 所示, 用磁子搅拌到达最大富集倍数的时间为 17 min, 而有磁流体粉末时萃取时间只需 15 min, 富集时间缩短了 2 min。因此, 选用萃取时间为 15 min。

2.2 方法比较

把实验“2.1 所得的最佳萃取条件, 分别用于传统的磁子搅拌萃取和磁流体萃取模式, 所富集的尼古丁的液相色谱图见图 4。从图 4 可见, 磁流体粉末处理的色谱图峰形更好(尖锐、对称且无明显拖尾), 峰高提高了近 1 倍(即富集倍数提高近 1 倍)。由图 3 和图 4 可见, 磁流体萃取模式可以在更短的时间内得到更高的富集倍数。

2.3 方法学参数考察

2.3.1 精密度 在优化的 TP-HF-LIME 条件下, 以 2 mL 20 mg/L 尼古丁标准溶液和 2 mL 0.05 mol/L KOH 溶液作为给出相, 平行萃取 5 次, 进样分析, 得相对标准偏差(RSD)为 2.3%。

2.3.2 工作曲线线性范围及相关系数 分别以不同浓度的尼古丁标准样品 2 mL 与 2 mL 0.05 mol/L

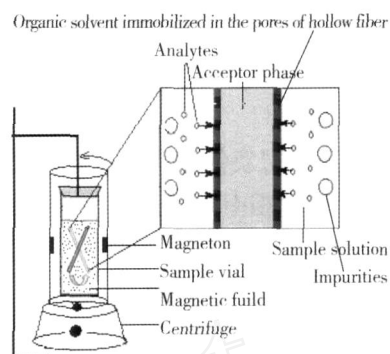


图 1 液相微萃取装置图

Fig. 1 Schematic diagram of liquid phase microextraction

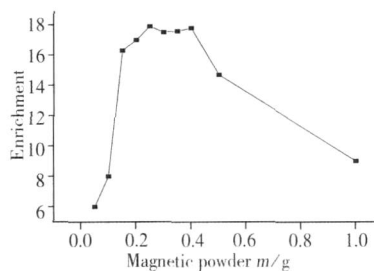


图 2 磁流体粉末的加入量与富集倍数的关系

Fig. 2 The effect of magnetic powder in sample on extraction efficiency

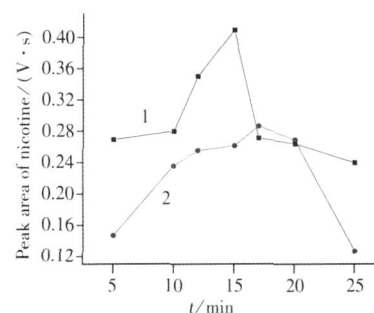


图 3 萃取时间对萃取效率的影响

Fig. 3 The effect of extraction time on extraction efficiency with different treatment methods

1. treated by magnetic fluid;
2. treated by stirring bar

KOH溶液混合作为给出相,按优化的 LME条件,微萃取后取 4 μL 接收相进样测定,得工作曲线线性范围 0.05 ~ 50 mg/L,相关系数 0.999 8。

2.3.3 富集倍数 将各浓度尼古丁标液按优化条件 TP - HF - LME后,接收相中尼古丁浓度相比于原始浓度,即得富集倍数。在优化的 TP - HF - LME条件下,富集倍数为 17.9倍。

2.4 样品的测定

先解冻尿样,分别取 4种尿样各 2 mL于样品瓶,分别加入含 0、10、20 mg/L尼古丁的 0.05 mol/L KOH溶液 2 mL,在优化的 TP - HF - LME条件下萃取后,进样测定。测定结果见表 1和图 5(图 5中,峰 1是每天吸烟多于 10支的男性(1[#])尿样中尼古丁含量,峰 2是每天吸烟小于 10支的男性(2[#])尿样中尼古丁含量,峰 3是被动吸烟的男性(3[#])尿样中尼古丁含量)。用标准加入法计算尿样中尼古丁,实验结果:即 1[#]尿样中尼古丁质量浓度为 5.39 mg/L,2[#]尿样中尼古丁质量浓度为 4.17 mg/L,3[#]尿样中尼古丁质量浓度为 2.08 mg/L,不抽烟且很少被动吸烟男性的尿样(4[#])中尼古丁含量低于检出限。实验结果与文献[12]的主动吸烟者为 5.40 mg/L,被动吸烟者为 2.22 mg/L基本吻合。被动吸烟者尿液中尼古丁的含量较高,说明长期暴露于香烟烟雾(ETS)环境中,对人体健康有较大危害。

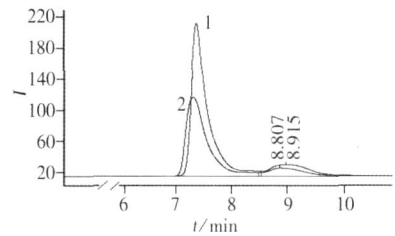


图 4 不同处理方法的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of different treatment methods

1. treated by magnetic fluid;
2. treated by stirring bar

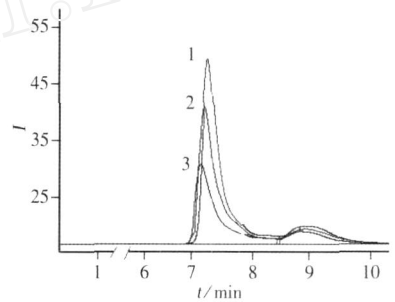


图 5 尿液样品色谱图

Fig. 5 Chromatograms of urine samples

表 1 不同尿样样品中的尼古丁含量和回收率

Table 1 Recovery and content of nicotine in different urine samples

Samples(No)	Added		Found ($n=5$)		Recovery(mean \pm S.D., %) ($n=5$)	
	$A / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$		$F / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	$\pm s_r / \%$	$R / \%$	$\pm s_r / \%$
4 [#]	0		-		-	
	10.00		9.91 \pm 0.17		99 \pm 1.67	
	20.00		19.46 \pm 0.24		94 \pm 1.18	
1 [#]	0		5.40 \pm 0.08		-	
	10.00		15.34 \pm 0.16		99 \pm 1.58	
	20.00		25.42 \pm 0.25		100 \pm 1.22	
2 [#]	0		4.22 \pm 0.09		-	
	10.00		14.18 \pm 0.11		99 \pm 1.09	
	20.00		24.12 \pm 0.27		97 \pm 2.68	
3 [#]	0		2.12 \pm 0.07		-	
	10.00		12.09 \pm 0.14		98 \pm 1.36	
	20.00		22.02 \pm 0.37		95 \pm 1.81	

3 结论

本文首次将磁流体粉末代替磁子,由于磁流体粉末能充满整个样品溶液,粉末在磁场中高速运动带动整个溶液的运动,加速传质;此外粉末形成流体直接作用于被分析物分子,使得目标分析物能在短时间内更快地进入接受相,从而在短时间内得到更高的富集倍数。将改进的 TP - HF - LME样品前处理方法应用到尿液中尼古丁含量的测定,该方法与文献[18]比较:富集倍数提高到了 17.9倍,具有好的重复性(测定的标准偏差小于 2.68%)和低的检出限(3 $\mu\text{g/L}$)。样品处理时间缩短 2 min,整个分析过程可在 25 min内完成,可用于生物体和环境样品中目标分析物的简单、快速和准确测定。

参考文献:

- [1] JARVISM, TUNSTALL - PEDOE H, FEYERABEND C, et al. Biological markers of smoke absorption and self-reported exposure to passive smoking[J]. J Epidemiol Commun Health, 1984, 38(4): 335 - 339.
- [2] WALL MA, JOHN SON J, JACOB P, et al. Cotinine in the serum, saliva, and urine of nonsmokers, passive smok-

- ers, and active smokers[J]. American Journal of Public Health, 1988, 78(6): 699 - 701.
- [3] 李德亮, 刘锰. 烟碱的色谱测定 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(4): 108 - 113.
- [4] QU NTANA J B, ROD L R, REEMTSMA T Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects[J]. J Chromatogr. A, 2004, 1061: 19 - 26
- [5] 胡雁, 杨俊, 谷勋刚, 等. 反相离子对高效液相色谱法同时测定头发中的尼古丁和可天宁 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(2): 77 - 80.
- [6] TUOMIT, JOHNSON T, REJULA K Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC - tandem mass spectrometry[J]. Clinical Chemistry, 1999, 45: 2164 - 2172
- [7] JAMES H, TIZABI Y, TAYLOR R. Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography - mass spectrometry[J]. J Chromatogr. B, 1998, 708(1): 87 - 93.
- [8] BEMERT J T, HARMON T L, SOSNOFF C S, et al Use of cotinine immunoassay test strips for preclassifying urine samples from smokers and nonsmokers prior to analysis by LC - MS - MS[J]. J Anal Toxicol, 2005, 29(8): 814 - 818.
- [9] XU Xu, MICHAEL M I, CLIFFORD P W. Simultaneous and sensitive measurement of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in human urine by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Clinical Chemistry, 2004, 50: 2323 - 2330
- [10] XU A S, PENGL L, HAVEL J A, et al Determination of nicotine and cotinine in human plasma by liquid chromatography - tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization interface[J]. J Chromatogr. B, 1996, 682(2): 249 - 257.
- [11] HU Yan, YANG Jun, CAI Jibao, et al A new molecularly imprinted polymer for selective extraction of cotinine from urine samples by solid-phase extraction[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(3): 761 - 768
- [12] DOCTOR P B, GOKAN I V N, KULKARNI P K, et al Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography[J]. J Chromatogr. B, 2004, 802(2): 323 - 328
- [13] PEDERSEN - BJERGAARD S, RASMUSSEN K E Liquid - liquid - liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis[J]. Anal Chem, 1999, 71(14): 2650 - 2656
- [14] VORA - ADISAKN, VARANUSUPAKUL P. A simple supported liquid hollow fiber membrane microextraction for sample preparation of trihalomethanes in water samples[J]. J Chromatogr. A, 2006, 1121(2): 236 - 241.
- [15] 杨新磊, 罗明标, 唐毓萍. 三相中空纤维式液相微萃取快速富集血浆中尼古丁的研究 [J]. 色谱, 2006, 24(6): 555 - 559.
- [16] LEE D K, KANG Y S, LEE C S et al Structure and characterization of nanocomposite Langmuir - Blodgett films of poly (maleic monoester) /Fe₃O₄ nanoparticle complexes[J]. J Phys Chem: B, 2002, 106(29): 7267 - 7271.
- [17] 赵汝松, 徐小白, 刘秀芬. 液相微萃取技术的研究进展 [J]. 分析化学, 2004, 32(9): 1246 - 1251.
- [18] HO T S, PEDERSEN - BJERGAARD S, RASMUSSEN K E Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid - liquid extraction[J]. J Chromatogr. A, 2002, 963(1/2): 3 - 17.
- [19] 张朝辉, 康绍英, 许敏洁. 液 - 液 - 液微萃取 /高效液相色谱法测定人血浆中的西地那非和伐地那非 [J]. 色谱, 2005, 23(4): 358 - 361.

(上接第 164 页)

- [5] BOMERGER H B. Alpha segregation in titanium alloys[C]// Kimura H, Izumi O eds Titanium '80 Science and Technology, New York: American Institute of Mining, Metallurgy, Petroleum, 1981: 2197 - 2202
- [6] BLENKINSOP P A. High temperature titanium alloys the metallurgical understanding, development and achievements of conventional alloys[C]// In: Neal D F ed Proc Japan International SAMPE Symposium, Tokyo: Institute of Metals, 1993: 1861 - 1868
- [7] 王寿彭. 铸件形成理论及工艺基础 [M]. 西安: 西北工业大学出版社, 1994: 115 - 126
- [8] 陈战乾, 高颀, 刘新, 等. Ti - 1023 合金铸锭铁偏析控制 [J]. 钛工业进展, 2003, 20(415): 56 - 58
- [9] 龔永庆. 钛合金的主要合金元素在铸锭中的分布 [C]//第六届全国钛及钛合金学术交流会文集. 北京: 原子能出版社, 1987: 43 - 48
- [10] 刘军林, 赵永庆, 周廉. Ti-2.5Cu, Ti-3Fe, Ti-3Cr 合金铸锭的偏析 [J]. 稀有金属材料与工程, 2004, 33(7): 731 - 735.