

XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG NICOTIN TRONG NƯỚC TIỂU BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾT LÔNG - RẮN VÀ GC/MS

PHẦN 1: TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH CHIẾT TÁCH VÀ ĐIỀU KIỆN ĐỊNH LƯỢNG NICOTINE TRONG NƯỚC TIỂU

Trần Thị Thanh Vân¹, Trịnh Thị Bích Thủy², Thành Thị Thu Thủy^{3,*}

¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KHCNVN,
2 Hùng Vương, Nha Trang

²Viện Pasteur Nha Trang, 8-10 Trần Phú, Nha Trang

³Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

*Email: thuyltt@ich.vast.ac.vn

Đến Tòa soạn: 23/3/2013, Chấp nhận đăng: 15/6/2013

TÓM TẮT

Mục đích của chúng tôi là nghiên cứu quy trình định lượng nicotine trong nước tiểu bằng phương pháp chiết lỏng rắn và sắc kí khí khối phổ (GC-MS). Trong phần 1, chúng tôi báo cáo quy trình tách chiết nicotine từ nước tiểu bằng kỹ thuật chiết lỏng-rắn, pha rắn là octadecyl silica (C18) và quy trình định lượng nicotine bằng phương pháp GC-MS. Kết quả chỉ ra rằng với phương pháp chiết lỏng - rắn độ thu hồi của nicotine trong nước tiểu là 73,91 % và giới hạn phát hiện là 0,03 ppm. Trong phần 2, chúng tôi sẽ báo cáo về kết quả phân tích định tính nicotine và các chất chuyển hóa chính của nó và áp dụng quy trình định lượng nicotine để phân tích 20 mẫu nước tiểu của những người không hút thuốc lá và 10 mẫu nước tiểu của những người hút thuốc lá ở nhà máy thuốc lá Khánh Hòa.

Từ khóa: urin, chiết lỏng-rắn, C18, GC/MS.

1. MỞ ĐẦU

Nicotin là một thành phần alkaloid chính được tìm thấy chủ yếu trong cây thuốc lá và có tên hóa học là 3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl). Chúng có độc tính cao nên dễ gây nhiễm độc hoặc tử vong. Trong môi trường sinh sống của chúng ta nicotine được phát tán từ khói thuốc lá do những người hút thuốc lá thải ra, từ nơi sản xuất các sản phẩm có chứa nicotine như sản xuất thuốc lá, thuốc trừ sâu từ nicotine.... Theo thống kê của các nhà nghiên cứu thì trong số công nhân tiếp xúc nghề nghiệp với nicotine có tỉ lệ ung thư phổi là 4 %, cao hơn rất nhiều so với công nhân làm việc trong môi trường không tiếp xúc với nicotine [1]. Do vậy khi muốn cảnh báo điều kiện an toàn lao động và khám phát hiện bệnh nhiễm độc nicotine nghề nghiệp cho công nhân chúng ta cần

phải khảo sát môi trường lao động và xét nghiệm hàm lượng nicotin trong các mẫu máu, nước tiểu....

Có rất nhiều phương pháp xử lý mẫu để tách, làm sạch và làm giàu nicotin như : chưng cất, chiết lỏng – lỏng, chiết pha rắn.... [2 - 6]. Đây là giai đoạn quan trọng nhưng cũng gặp nhiều khó khăn nhất do nền mẫu phân tích là các đối tượng mẫu khác nhau, ví dụ như mẫu nước tiểu, nền mẫu này cực kỳ phức tạp, nó phụ thuộc vào chế độ ăn uống, sinh hoạt của từng cá nhân. Bên cạnh đó, nicotin trong nước tiểu dễ bị chuyển hóa thành 20 chất chuyển hóa khác nhau, trong đó chất chuyển hóa chính là cotinin [2, 3, 4]. Chính vì lí do nêu trên mà chỉ có một số ít công trình đưa ra qui trình chuẩn xác định nicotin trong mẫu một cách đơn giản. Các công trình công bố chỉ dừng lại là tìm các điều kiện thiết bị với chế độ đo tối ưu, thay đổi các điều kiện tách và làm giàu nicotin trong các đối tượng mẫu khác nhau để nâng cao độ chính xác và độ nhạy của phương pháp xác định.

Mục đích của chúng tôi là nghiên cứu quy trình phân tích định lượng nicotin trong nước tiểu bằng phương pháp chiết lỏng rắn và phương pháp sắc kí khí khối phổ (GC-MS). Trong phần 1 này của công trình, chúng tôi báo cáo quy trình tách chiết nicotin từ nước tiểu bằng kỹ thuật chiết lỏng-rắn, pha rắn là octadecyl silica (C18) và quy trình định lượng nicotin bằng phương pháp GC-MS. Các kết quả về phân tích định tính và định lượng nicotin và các chất chuyển hóa của nó trong nước tiểu sẽ được báo cáo trong phần 2.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều có độ tinh khiết siêu sạch của Merck và Prolabor. Mẫu nicotin chuẩn của Merck.

2.2. Chiết tách nicotin từ nước tiểu

- Mẫu nước tiểu: Mẫu nước tiểu được thu trong vòng 24 giờ từ 30 người trong đó có 20 người không hút thuốc lá và 10 người hút thuốc lá của công nhân nhà máy thuốc lá Khánh Hòa. Các mẫu sau khi thu được bảo quản tại nhiệt độ -2 °C. Mẫu sau đó loại muối và cặn bằng cách thêm dung dịch đệm borat pH = 10 theo tỉ lệ về thể tích là 1 : 10, sau đó li tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút thu được mẫu nước tiểu dùng cho các thí nghiệm.

- Chiết nicotin và chất chuyển hóa chính từ nước tiểu: Dựa theo phương pháp chiết lỏng-rắn của Edward E. K. Baidoo và cộng sự [2]. Sử dụng cột C18, trước tiên cho 6 ml methanol và 6 ml nước cất (milli-Q) đi qua cột, tiếp theo là 100 ml mẫu nước tiểu sau đó là 6 ml nước cất. Mẫu được rửa giải với 6 ml methanol. Dung dịch rửa giải được làm khô bằng khí N₂ và hòa tan lại trong 1 ml methanol. Sau đó ly tâm tại 3000 vòng/phút trong 20 phút. Loại cặn thu được dung dịch nicotin và các chất chuyển hóa chính.

2.3. Phương pháp GC/MS

Máy sắc kí khí khối phổ GC/MS- 6890N/5973 Agilent (Mỹ). Sử dụng cột HP-5MS, chiều dài 30 m, đường kính trong 0,25 mm, bề dày pha tĩnh 0,25 µm. Chế độ chạy mẫu: Tốc độ khí mang Heli là 1,8 ml/phút, chương trình gradient nhiệt độ: 55 °C giữ 2 phút, tăng 20 °C/phút đến 215 °C và chạy ở 280 °C trong 6 phút. Chạy theo chế độ SIM (Selected Ion Monitor).

- Khảo sát khoảng tuyến tính: Nghiên cứu sự tương quan của nồng độ nicotin thay đổi theo diện tích pic (số đếm) của mảnh định lượng từ đó tìm khoảng tuyến tính.

- Độ nhạy của phương pháp: Giới hạn phát hiện (LOD) là nồng độ nhỏ nhất trong dãy chuẩn có diện tích pic trung bình cao ít nhất gấp 3 lần diện tích pic của mẫu trắng. Giới hạn định lượng (LOQ) là nồng độ nhỏ nhất trong dãy chuẩn có diện tích pic trung bình cao gấp 10 lần diện tích pic của mẫu trắng.

- Độ lặp lại của phương pháp: Phân tích 5 mẫu nước tiểu theo cùng một quy trình xử lý mẫu và bơm vào máy sắc kí khí khối phổ, dựa vào kết quả thu được tính độ lặp lại của phương pháp.

- Độ thu hồi: Phân tích các mẫu nước tiểu với nồng độ nicotin biết trước. Kết quả thu được tính giá trị trung bình của độ thu hồi.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định điều kiện chiết mẫu tối ưu

Hai hệ dung môi chiết lỏng/ lỏng (toluen : n-hexan và dichloromethan) và một hệ cột (cột C18 và dung môi là methanol) đã được lựa chọn để tìm ra điều kiện chiết mẫu nicotin tối ưu thông qua hệ số thu hồi và độ sạch của mẫu phân tích sau khi chiết. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 7 lần để tìm giá trị độ thu hồi trung bình. Kết quả đưa ra ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thực nghiệm trên một số dung môi chiết và làm sạch.

	Độ thu hồi của nicotine trong mẫu nước tiểu (%)		
	Toluen/n-hexane	Dichloromethane	C18/ methanol
1	78,62	84,21	71,48
2	75,78	82,36	69,90
3	72,56	81,74	80,85
4	76,32	79,13	79,98
5	77,14	83,14	75,78
6	75,12	78,56	69,55
7	77,48	80,72	69,83
Trung bình	76,15	81,41	73,91

Theo các tác giả [7 - 10] thì độ thu hồi nicotin trong khoảng từ 53,0 % (đối với mẫu phức tạp như máu, nước bọt, không khí) đến 82,8 % (đối với các mẫu đơn giản như lá cây thuốc lá) . Theo kết quả bảng 1, độ thu hồi nicotin là 76,15 %; 81,41 % đối với kĩ thuật chiết lỏng - lỏng và 73,91 % đối với kĩ thuật chiết pha rắn (SPE). Như vậy có thể sử dụng cả 02 phương pháp để chiết nicotin trong mẫu nước tiểu, tuy nhiên khi so sánh độ sạch của mẫu chiết khi sử dụng hai phương pháp trên, chúng tôi thu được kết quả là độ sạch của mẫu chiết theo phương pháp SPE tốt hơn nhiều do vậy hệ cột C18/ methanol được chọn để chiết và làm sạch mẫu.

3.2. Xác định điều kiện đo GC/MS

3.2.1. Khảo sát điều kiện máy

- Khí mang: Do khí heli có độ sạch cao, an toàn khi sử dụng và là khí mang được sử dụng nhiều nhất khi phân tích trên hệ GC-MS. Do vậy, heli được chọn thay cho các khí mang thông dụng khác.

- Chương trình nhiệt độ: 3 chương trình nhiệt độ đã được khảo sát: Chương trình 1: 50 °C giữ 2 phút, tăng 15 °C/phút đến 300 °C và giữ 11 phút. Tốc độ dòng 1,2 lít/phút.

- Chương trình 2: 50 °C giữ 2 phút, tăng 15 °C/phút đến 215 °C và giữ tại 280 °C trong 6 phút. Tốc độ dòng 1,5 lít/phút.

- Chương trình 3: 55 °C giữ 2 phút, tăng 20 °C/ phút đến 215 °C và giữ tại 280 °C trong 6 phút. Tốc độ dòng 1,8 lít/phút.

Kết quả cho thấy chương trình 3 cho pic nhọn đường nền mịn hơn chương trình 1 và 2. Để có thể đánh giá chính xác hơn hiệu quả của chương trình nhiệt độ đến khả năng tách của cột, chúng tôi tính toán các thông số: tốc độ dòng, tổng thời gian phân tích, số đĩa lý thuyết của cột sắc kí và kết quả đưa ra ở bảng 2.

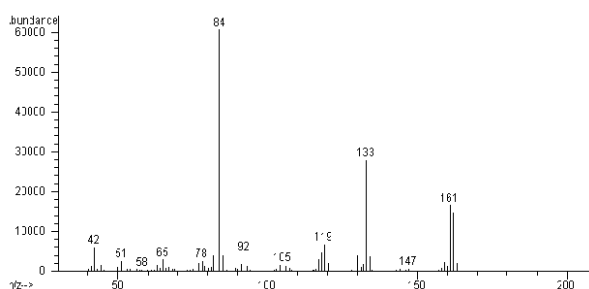
Bảng 2. Thời gian lưu và tổng thời gian phân tích.

Chương trình chạy	Tốc độ dòng (lít/phút)	Thời gian lưu (phút)	Số đĩa lý thuyết hiệu dụng/mét (n/m)	Tổng thời gian phân tích (phút)
1	1,2	9,71	838	30
2	1,5	9,15	650	19
3	1,8	7,67	1030	16

Số liệu bảng 2 cho thấy rằng chương trình nhiệt độ 3 có thời gian phân tích ngắn nhất: 16 phút, hiệu quả cột tách khá cao 1013 đĩa/m và kết hợp với đường nền sắc kí đồ đẹp, do vậy chúng tôi chọn chương trình nhiệt độ 3.

3.2.2. Khảo sát điều kiện định lượng nicotin

- Xác định mảnh định lượng



Hình 1. Phổ GC/MS của mẫu nicotin chuẩn.

Để có thể nghiên cứu định lượng bằng phương pháp GC/MS. Cần phải xác định được mảnh định lượng và mảnh tham chiếu. Phổ GC/MS của mẫu nicotine chiết tách từ nước tiểu được đưa ra trong hình 1.

Trên phổ có mảnh cơ bản $m/z = 84$, ngoài ra và một số pic có cường độ trung bình và nhỏ tại $m/z = 133, 161, 119$ và 42 , ngoài ra còn một số peak có cường độ rất nhỏ khác. Trong nghiên cứu định lượng nicotin, mảnh cơ bản $m/z = 84$ thường được chọn làm mảnh định lượng và chúng tôi chọn mảnh 161 và 162 làm mảnh tham chiếu.

Sau khi xác định được mảnh định lượng và mảnh tham chiếu, chúng tôi tiến hành tìm tỉ lệ giữa các mảnh này trong mẫu chuẩn nicotin và từ đó tìm ra độ dao động của các tỉ lệ này để làm cơ sở xác nhận hợp chất cần phân tích, tránh sai số do nhầm lẫn giữa các chất giống nhau. Sau khi phân tích chất chuẩn nicotin với các nồng độ khác nhau, chúng tôi đã tính được tỉ lệ giữa các mảnh (bảng 3).

Bảng 3. Tỉ lệ mảnh trong chuẩn nicotin.

Chuẩn nicotin	Mảnh 84 (Abundance)	Mảnh 161 (Abundance)	Tỉ lệ mảnh 161/mảnh 84 (%)	Mảnh 162 (Abundance)	Tỉ lệ mảnh 162/mảnh 84 (%)
1	969	259	26,73	189	19,50
2	1967	504	25,62	412	20,95
3	3910	1078	27,57	995	25,45
4	11058	3061	27,68	2643	23,90
5	259584	71624	27,59	64016	24,66
6	1045	265	25,36	213	20,38
7	1826	469	25,68	394	21,58
8	5156	1416	27,46	1292	25,06
9	843	234	27,76	203	24,08
10	1886	409	21,69	305	16,17
11	843	234	27,76	204	24,20
12	349	93	26,65	105	30,09
Trung bình			26,46		23,00
Biên độ dao động chấp nhận			5,29		4,60
Giá trị min			21,17		18,40
Giá trị max			31,76		27,60

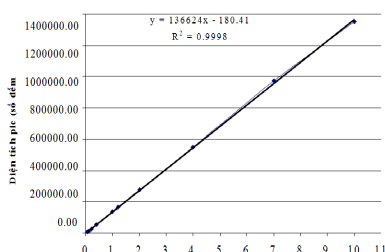
Kết quả bảng 3 cho thấy, các phân đoạn rửa dải có nồng độ nicotin chuẩn khác nhau nhưng luôn luôn có tỉ lệ mảnh nằm trong khoảng sau: Mảnh 161: 21,17 – 31,76 %, Mảnh 162: 18,40 – 27,60 %. Điều này chứng tỏ rằng mặc dù sự phân mảnh của nicotin phụ thuộc vào một số yếu tố như độ bền của mảnh ion, độ bền của mảnh trung hoà và cực tiểu hoá năng lượng nhưng cùng điều kiện phân mảnh xác xuất hình thành các mảnh đặc trưng là gần như nhau. Vì vậy khi phân tích định lượng nicotin dựa trên mảnh đặc trưng và tham chiếu thì sự dao động của các tỉ lệ giữa các mảnh này phải nằm trong khoảng tương ứng với tỉ lệ đối với mẫu chuẩn và là 26,46 % \pm 5,29 % đối với mảnh $m/z = 161$; 23,00 % \pm 4,6 % đối với mảnh $m/z = 162$.

Ngoài ra số phân đoạn rửa giải của mẫu phân tích trong quá trình chiết lỏng – rắn, và thể tích dung môi mỗi lần rửa giải cũng được xác định dựa vào sự cố mặt của các mảnh định lượng và mảnh tham chiếu và tỉ lệ mảnh giữa chúng trong từng phân đoạn rửa giải khác nhau, kết quả số lần rửa giải là 3 lần và dung môi rửa giải là 3 ml.

Để đánh giá khả năng ứng dụng của qui trình chạy mẫu trên chúng tôi tiến hành xác định khoảng tuyến tính, độ nhạy của phương pháp, độ lặp lại, độ thu hồi.

- *Khảo sát khoảng tuyến tính*

Để xác định khoảng tuyến tính, các khoảng nồng độ của mẫu nicotine chuẩn đã được khảo sát bằng nghiên cứu sự tương quan của nồng độ nicotin trên diện tích pic (số đếm) của mảnh định lượng $m/z = 84$. Kết quả cho thấy khoảng nồng độ 0,05 – 10 ppm có độ tuyến tính cao nhất $R^2 = 0,998$ (hình 2).



Hình 2. Đồ thị biểu diễn khoảng tuyến tính của nicotin (0,05 – 10 ppm).

- *Xác định giới hạn phát hiện, độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp*

- Giới hạn phát hiện LOD: Thu thập 10 mẫu nước tiểu của các đối tượng không hút thuốc, gia đình không có người hút thuốc ít tiếp xúc với nicotin, trộn đều và sử dụng làm mẫu trắng. Chiết mẫu theo quy trình, sau đó chạy trên máy GCMS. Dùng mẫu chuẩn phân tích theo nồng độ giảm dần từ 0,2 - 0,02 ppm chúng tôi thu được diện tích mảnh 84 tương ứng. Từ kết quả đó cho thấy diện tích mảnh 84 tại nồng độ 0,03ppm còn cao gấp 3 lần so với nhiễu nền của mẫu trắng tại cùng thời gian lưu. Vậy ngưỡng phát hiện (LOD) là 0,03 ppm.

Bảng 4. Kết quả phân tích độ thu hồi của phương pháp.

Đợt mẫu	Hàm lượng nicotin thu hồi (ppm)				Tỉ lệ thu hồi (%)
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3	Trung bình	
1	0,2903	0,2875	0,2799	0,2859	71,48
2	0,2772	0,2762	0,2854	0,2796	69,90
3	0,3240	0,3269	0,3193	0,3234	80,85
4	0,3190	0,3174	0,3234	0,3199	79,98
5	0,3069	0,3067	0,2957	0,3031	75,78
6	0,2783	0,2777	0,2786	0,2782	69,55
7	0,2843	0,2848	0,2688	0,2793	69,83
Trung Bình				0,2956	73,91

- Độ lặp lại: Để thử nghiệm độ lặp lại của phương pháp, chúng tôi tiến hành phân tích 5 mẫu nước tiểu theo cùng một qui trình xử lý mẫu và bơm vào máy sắc kí khí khối phổ, kết quả thu được như sau: $X = 0,8989 \pm 0,0094$ ppm, CV = 1,05 %.

- Độ thu hồi: Để kiểm tra độ thu hồi của phương pháp, chúng tôi tiến hành trên 21 mẫu nước tiểu với nồng độ nicotin biết trước 0,4 ppm. Kết quả đưa ra trên bảng 4.

Từ kết quả của bảng 4 cho thấy độ thu hồi của phương pháp là 73,91 %.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được quy trình chiết tách lỏng-rắn tối ưu để chiết được nicotin trong nước tiểu với độ thu hồi là 73,91 %. Đã xây dựng được quy trình định lượng nicotin trong nước tiểu bằng phương pháp GC/MS với giới hạn phát hiện là 0,03 ppm. Kết quả về phân tích định tính và định lượng nicotin và các chất chuyển hóa của nó trong nước tiểu sẽ được chúng tôi báo cáo trong bài báo tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hội nghị khoa học Y học lao động toàn quốc lần thứ IV, Báo cáo tóm tắt, 2001 tr. 17, 197.
2. Edward E. K. Baidoo, Malcolm R. Clench, Robert F. Smith, Lee W. Tetler - Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* **796** (2003) 303–313.
3. Ho-Sang Shin, Jin-Gu Kim, Yoon-Jeong Shin, Sun Ha Jee - Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* **769** (2002) 177-183.
4. Allan S. Xu, Lana L. Pg, James A. Havel, Mary E. Petersen, John A. Fiene, James D. Hulse - Determination of nicotine and cotinine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization interface, *Journal of Chromatography B* **682** (1996) 249-257.
5. Al-Tamrah S. A. - Spectrophotometric determination of nicotine, *Analytica Chimica Acta* **379** (1999) 75-80.
6. Baranowski J., Pochopien G., Baranowska I. - Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high- performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* **707** (1998) 317-321.
7. Doctor P. B., Gokani V. N., Kulkarni P. K., Parikh J. R., Saiyed H. N. - Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography, *Journal of Chromatography B* **802** (2004) 323-328.
8. Jinchao Shen, Xueguang Shao - Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography - mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step, *Analytica Chimica Acta* **561** (2006) 83-87.
9. Teresa R. Gray, Daa M. Shakleya, Marilyn A. Huestis - Quantification of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, nornicotine in human meconium by liquid

chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* **863** (2008) 107-114.

10. Xu Xu, Michael M. Iba, Clifford P. Weisel - Simultaneous and sensitive measurement of anabasine, nicotine, nicotine metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinical Chemistry* **50** (12) (2004) 2323-2330.

ABSTRACT

DETERMINATION OF NICOTINE IN HUMAN URINE BY USING SOLID-LIQUID EXTRACTION AND GC/MS

PART 1: OPTIMIZATION OF EXTRACTION AND DETERMINATION OF NICOTINE

Tran Thi Thanh Van¹, Trinh Thi Bich Thuy², Thanh Thi Thu Thuy^{3,*}

Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST. 2 Hung Vuong, Nha Trang

Nha Trang Pasteur Institute, 8 - 10 Tran Phu, Nha Trang

Institute of Chemistry, VAST. 18 Hoang Quoc Viet, Hanoi

*Email: thuyttt@ich.vast.ac.vn

The aim of our research is to determine the content of nicotine in urine by using solid-liquid extraction technique and gas chromatography- mass spectrometry (GC-MS). In this part of the work, the procedures include isolation of nicotine from urine by solid-liquid extraction technique using octadecyl silica (C18) and determination of nicotine by the GC-MS by the GC-MS are reported. The recovery of nicotine is 73.91 % and the limit of detection (LOD) is 0.03 ppm. The results in determination of nicotine and its metabolite in urine samples taken from 20 non-smoking and 10 smoking volunteers will be reported in part 2.

Keywords: urine, solid -liquid extraction, C18, GC/MS.