



## 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

杨俊 胡雁 蔡继宝 朱晓兰 谷勋刚 高芸 苏庆德\*

(中国科学技术大学烟草与健康研究中心 合肥 230052)

**摘要:** 本文以庚烷磺酸钠为离子对试剂,建立了同时测定头发中尼古丁和可天宁含量的反相离子对高效液相色谱方法。使用反相Zorbax SB-C18柱为分离柱,流动相为乙腈—含2mmol/L庚烷磺酸钠的8mmol/L pH值为3.0的磷酸盐缓冲溶液(V/V=15:85),紫外检测波长为260nm,以2-苯基咪唑为内标物。尼古丁和可天宁的线性范围为0.2~50 $\mu$ g/mL,相关系数分别为0.9999和0.9987,标准加入回收率为90.5%~93.8%和94.6%~98.6%,相对标准偏差(RSD)分别小于1.6%和2.7%。

**关键词:** 反相离子对高效液相色谱;尼古丁;可天宁;头发

A reversed-phase ion-pair high-performance chromatographic simultaneous determination of nicotine and cotinine in human hair

Yang Jun Hu Yan Cai Ji-bao Zhu Xiao-lan Gu Xun-gang Gao Yun Su Qing-de\*

(Research Center of Tobacco and Health,

University of Science and Technology of China, Hefei 230052)

**Abstract:** An simultaneous assay for nicotine and cotinine in human hair based on reversed-phase HPLC with sodium heptane sulfonate used as an ion-pair reagent is developed. The chromatographic separation was performed in reversed-phase Zorbax SB-C18 column. Mobile phase consisting of acetonitril—the mixture of 8mmol/L phosphoric acid solution containing 2mmol/L sodium heptane sulfonate solution (15:85, V/V). The eluate was detected by UV detector at 260nm. 2-phenylimidazole is used as the internal standard. The linearity was obtained in the range of 0.2~50 $\mu$ g/mL concentrations of nicotine and cotinine standards. The correlantion coefficients were 0.9999 for nicotine and 0.9987 for cotinine. The recoveries of nicotine and cotinine were 90.5%~93.8% and 94.6%~98.6%, respectively.

**Key words:** Reversed-phase ion-pair HPLC; Nicotine; Cotinine; Human hair

尼古丁(Nicotine),又称烟碱,是烟草及其制品中含量最丰富的生物碱,也是导致吸烟成瘾的物质动因;可天宁(Cotinine)是尼古丁在人体代谢过程中的主要产物。尼古丁和可天宁分布于人体头发和体液中,作为重要的生物标记物,常用以衡量烟草对人体健康的影响程度,受到生物医学、环境科学及烟草健康研究的广泛重视。尼古丁和可天宁在头发中的半衰期长于在血液、唾液等体液中的半衰期,通过对头发中尼古丁和可天宁的分析,可以获得人体长期暴露于烟草烟气对健康影响的相关信息。

目前,测定头发中尼古丁和可天宁含量的方法主要包括气相色谱法(GC-MS)、放射免疫分析法(RIA)和高效液相色谱法(HPLC-MS)<sup>[1]</sup>,其中GC-MS、HPLC-MS、RIA方法灵敏、准确<sup>[2]</sup>,但检测成本较高,尚不普及。HPLC方法简便、快捷,但生物碱类物质在反相色谱柱的保留性能有待改进<sup>[3]</sup>。使用离子对试剂可以和分析物的离子结合形成中性离子对,有效改善色谱流出,提高分离度。因此本文建立了反相离子对高效液相色谱测定尼古丁和可天宁的分析方法,并成功地应用于主动吸烟人群和被动吸烟人群头发中的尼古丁和可天宁的检测具有分析速度快、准确度高、实用性强等优点。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100高效液相色谱仪, DAD二极管阵列检测器, HP Chemstation

尼古丁(98%, MERCK); 可天宁(98%, SIGMA); 庚烷磺酸钠(HPLC, TEDIA); 2-苯基咪唑

(95%, ACROS); HCl, NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>、NaOH及H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub>均为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯 (TEDIA); 水为二次亚沸石英蒸馏水。

### 1.2 标准溶液的配制

以乙腈为溶剂, 分别配制1.00g/L 的尼古丁标准溶液和0.50g/L的可天宁标准溶液; 以甲醇为溶剂, 配制浓度为0.25g/L的2-苯基咪唑内标溶液。三种溶液均在4℃保存备用。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: Zorbax SB-C18(150×4.6mmID, 5μm, Agilent); 流动相: 乙腈-含2mmol/L庚烷磺酸钠的8mmol/L磷酸盐缓冲溶液 (V/V=15:85); 流速1.0mL/min, 柱温35℃, 紫外检测波长260nm, 进样量20μL。

### 1.4 样品处理方法

称取头发样品50mg, 依次用去离子水、二氯甲烷振荡洗涤, 加入1mol/LNaOH溶液1mL, 50℃水浴14小时。冷却后加入10μL内标溶液, 用2mL二氯甲烷萃取两次 (2mL×2), 合并萃取液, 加入1mL5%HCl甲醇溶液, 45℃氮气吹扫至干。用400μL流动相定容, 经0.45μm微孔滤膜过滤, HPLC测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 离子对试剂的影响

尼古丁和可天宁均为生物弱碱, 溶液中易质子化为阳离子, 采用通常的反相高效液相色谱测定, 它们在固定相上的分配极小, 难以保留。若加入适当的负离子基团, 与尼古丁、可天宁阳离子缔合成具有疏水性的离子对, 可增大分析物在固定相中的保留时间, 获得较好的分离效果。由于尼古丁和可天宁在酸性环境中才可完全离解, 选用存在形式受pH值影响较小的强酸盐离子对试剂磺酸钠; 尼古丁 (图1A) 和可天宁 (图1B) 本身有10个碳原子, 具有较大的范德华体积, 当存在有机负离子基团与其配对或缔合时, 与反相固定相具有较强的结合力, 无需较长碳链的离子对试剂, 因此选用有七个碳的庚烷磺酸钠为离子对试剂。实验考查了庚烷磺酸钠在0~12mmol/L浓度范围内对样品保留值的影响: 庚烷磺酸钠浓度在0~4mmol/L之间, 尼古丁和可天宁的保留值均随庚烷磺酸钠浓度的增大而不同程度地增大; 而庚烷磺酸钠浓度大于4mmol/L时, 尼古丁和可天宁的保留值趋于稳定, 不再提高。考虑到分离效率和分离速度, 试验选择庚烷磺酸钠的浓度为2mmol/L。



图1 标准样品的化学结构

Figure 1 the chemical structures of the standards

离子对试剂与样品组分之间的结合程度和计量关系是影响样品保留值的又一重要因素<sup>[4]</sup>。离子对试剂和样品之间的结合程度越好、样品缔合离子对试剂的计量数越大, 形成的离子对与固定相之间的结合力越强, 样品保留值越大。尼古丁和可天宁的结构相似, 与离子对试剂的结合程度相当。影响尼古丁和可天宁保留时间的主要因素是它们与离子对试剂缔合时的缔合比。尼古丁吡啶环和吡咯环上有两个碱性氮原子以1:2与庚烷磺酸钠缔合, 可天宁仅有吡啶环上的一个碱性氮原子与庚烷磺酸钠1:1缔合。尼古丁与离子对试剂的缔合比大于可天宁, 其保留时间比可天宁长。从色谱图 (图3) 中可以看出, 可天宁先于尼古丁洗脱出来。

### 2.2 流动相的影响

2.2.1 pH值的影响 在反相离子对色谱中, 流动相pH值对样品组分的容量因子 $k'$ 影响很大。通过调节pH值, 可以控制样品及离子对试剂的离解程度。考察pH值在2.0~8.0范围内, 尼古丁、可天宁容量因子 $k'$ 的变化, 见图2所示。在pH2~8范围, 随pH减小,  $k'$ 逐渐增大; pH2~3时,  $k'$ 增大缓慢, 趋于最大值。当pH>5时, 可天宁 ( $pK_a=4.70$ ) 离解被抑制,  $k'$ 随pH的减小增长缓慢; 尼古丁

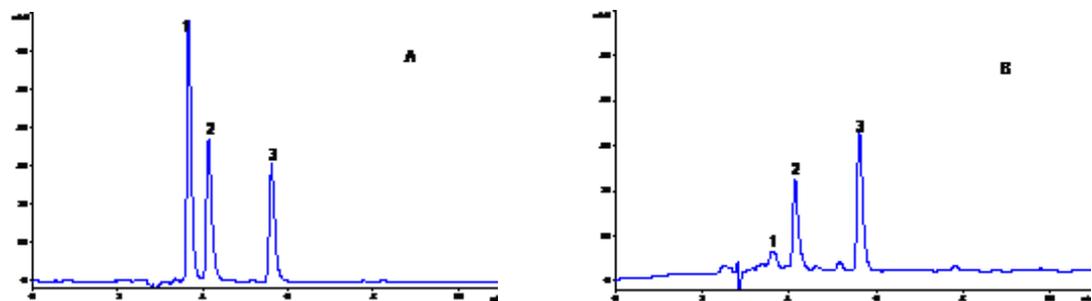
( $pK_{a1}=3.12, pK_{a2}=8.02$ ) 此时不能充分离解, 其有部分为单质子态,  $k'$ 的增长趋势强于可天宁。当pH<5时, 尼古丁、可天宁的离解度均增加,  $k'$ 随pH值的减小而迅速增加。pH为3左右时, 两者已完全离解,  $k'$ 受pH影响变小, 增加幅度变小。考虑到色谱柱在强酸性条件下的稳定性, 实验选取pH3.0的磷酸盐缓冲溶液作为流动相。

图2 流动相pH值对尼古丁和可天宁保留值的影响

Figure2 The effect of mobile phase pH on the retention of nicotine and cotinine

2.2.2 流动相组成的影响 反相色谱中溶质主要受极性溶剂的排斥力与固定相上的键合烷基发生疏溶剂化缔合作用而在固定相上有保留。所以, 随着流动相中乙腈含量的变化, 流动相的极性也随之改

变, 从而影响溶质的疏溶剂缔合作用力, 导致组分的保留值发生变化。乙腈含量增大, 流动相极性变小, 疏溶剂缔合作用减弱, 样品保留值减小; 反之则样品保留值增大。实验对不同含量的乙腈研究发现: 乙腈含量越高 (>20%), 各组分保留值越小, 分离效果差; 乙腈含量越低 (<10%), 保留值越大, 色谱峰形增宽, 影响分离效果且分析周期加长。适宜的乙腈含量为15%。



1. 可天宁 (cotinine); 2. 尼古丁 (nicotine); 3. 2-苯基咪唑 (2-phenylimidazole)  
图3 标准样品和头发样品的色谱图 (A 标准样品; B 头发样品)

Figure3 Chromatograms of standard and human hair samples internal standard (A standard samples; B human hair samples)

### 2.3 线性范围及检出限

将不同的浓度尼古丁和可天宁系列标准溶液, 按1.3节色谱条件测定, 回归方程及检出限 (S/N=3: 1) 见表1。其中Y表示被测物与内标峰面积之比, X表示样品浓度。尼古丁和可天宁在0.2~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内具有良好线性关系。

表1 被测化合物的回归方程、相关系数r和检出限

Table1 Regression equations, correlation coefficients and detection limit of the determined compounds

Compound	Regression equation	Correlation coefficient r	Detection limit $\alpha$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Nicotine (尼古丁)	$Y=7.040X-1352$	0.9999	0.03
Cotinine (可天宁)	$Y=10.482X-13.630$	0.9987	0.07

### 2.4 回收率和精密度

分别取一定量的尼古丁和可天宁的标准溶液, 加入到头发样品中按1.4节方法处理[5]并测定其含量。尼古丁、可天宁的回收率分别在90.5%~93.8%和94.6%~98.6%之间, 相对标准偏差 (RSD) 分别小于1.6%和2.7%, 分析方法精密度好。见表2。

表2 回收率和精密度 (n=6)

Table2 Recovery and Precision (n=6)

Compound	Added ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Detected ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recovery/%	RSD/%
Nicotine (尼)	0	18.36	/	1.28
	1.0	19.26	91.5	1.55
	10.0	27.41	90.5	1.53
	20.0	37.12	93.8	1.47
Cotinine (可)	0	2.66	/	1.96
	1.0	3.61	94.6	2.68
	10.0	12.21	95.5	2.22
	20.0	22.38	98.6	2.57

### 2.5 实际样品分析

头发样品取自主动吸烟人群和长期暴露于环境香烟烟雾 (ETS) 的被动吸烟人群, 测定前-18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻

保存。样品按1.4节方法处理后测定，色谱图见图3B。计算得主动吸烟者头发中尼古丁的含量为23.9ng/mg，可天宁为1.9ng/mg；被动吸烟者头发中尼古丁的含量为6.3ng/mg，可天宁未检出。结果表明，尼古丁在主动吸烟者和被动吸烟者中均可测得，可天宁仅在主动吸烟者的头发中可以检测到。因此，可以通过头发中可天宁的有无区分主动吸烟者和被动吸烟者，这与文献<sup>[2]</sup>报道一致。同时，被动吸烟者头发中尼古丁的含量较高，说明长期暴露于ETS环境中，对人体健康有较大危害。

### 3 结论

本文建立了同时测定尼古丁和可天宁的离子对高效液相色谱检测方法，具有快速简便、灵敏度高、重复性好的优点。用于头发样品的检测，可准确提供较长时间烟草摄入量对人体健康程度的影响信息，适用于实际样品中尼古丁和可天宁的常规分析。

### 参考文献

- [1]LI Deliang, LIU Meng. [J]. Journal of Instrumental Analysis(李德亮, 刘 锰. [J]. 分析测试学报), 2003, 22 (4) :108-113
- [2]THANEEYA C, AKIRA T, RYOICHI K, et al. [J].Biomed.Chromatogr. 2004, 18: 655-661
- [3]SIMONA P, ILARIA A, MANUELA P, et al. [J].Forensic Science International, 1997, 84:253-258
- [4]ZOU Hanfa, ZHANG Yukui, HONG Mingfang, et al. [J].Chinese Journal of Analytical Chemistry(邹汉法, 张玉奎, 洪名放等. [J]. 分析化学), 1994, 4 (4) :403-409
- [5]GRAME N, MAHONEY A D. [J].J.Chromator. B. 2001 ,753 :179-187

【打印】 【关闭】

Copyright 2004 <http://www.tobacco.org.cn/> Inc. All rights reserved.

版权所有：中国烟草学会