



XÁC ĐỊNH NICOTINE NIỆU CỦA CÔNG NHÂN LÀM VIỆC TRONG CÔNG TY SẢN XUẤT THUỐC LÁ BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ KHỐI PHỔ KẾT HỢP VỚI KỸ THUẬT CHIẾT LỎNG – LỎNG

Bùi Văn Huy^{1*}, Lê Vũ Đăng Giao¹, Trương Quý Tùng²

¹ Viện Pasteur Nha Trang, 08 Trần Phú, Nha Trang, Khánh Hòa, Việt Nam

² Đại Học Huế, 03 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Nicotine niệu là một trong những chỉ tiêu cận lâm sàng để đánh giá mức độ tiếp xúc và giám định bệnh nhiễm độc nicotine nghề nghiệp. Phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử cũng như phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC/MS) với kỹ thuật chiết pha rắn trước đây đã được nghiên cứu và áp dụng, nhưng độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp còn thấp. Kỹ thuật chiết lỏng – lỏng và phân tích trên GC/MS tiếp tục được nghiên cứu và ứng dụng tại phòng thí nghiệm của Viện Pasteur Nha Trang. Nicotine trong nước tiểu của công nhân được chiết bằng hỗn hợp dung môi dichloromethane – hexane (1:1 v/v) trong môi trường kiềm; phần dung môi hữu cơ được cô cạn dưới tác dụng của dòng khí nitơ, sau đó hòa tan lại bằng dung môi toluen và phân tích trên hệ thống GC/MS. Phương pháp xây dựng có giới hạn phát hiện 2,0 µg/L, hiệu suất thu hồi từ 80 % đến 109 % và độ lệch chuẩn tương đối từ 4,6 % đến 9,7 %. Kết quả phân tích hàm lượng nicotine niệu của công nhân hút và không hút thuốc lá lần lượt là 0,013–3,324 mg/L ($n = 124$) và 0,006–1,550 mg/L ($n = 423$).

Từ khóa: chiết lỏng– lỏng, nicotine niệu, GC/MS

1 Mở đầu

Thuốc lá là một trong những sản phẩm có số người sử dụng nhiều trên thế giới, khoảng 1,1 tỉ người trong năm 2015 [13]. Việc sản xuất thuốc lá tuy không được khuyến khích nhưng ngày càng phát triển và mở rộng cùng với sự gia tăng mạnh về thị trường tiêu thụ. Ngành công nghiệp thuốc lá đã mang lại lợi ích không nhỏ về kinh tế cũng như xã hội cho nhiều quốc gia. Tuy nhiên, xét về mặt tác hại, thuốc lá có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sức khỏe người lao động. Vào năm 1998, Ehsay đã đề cập đến ảnh hưởng sinh học ở công nhân tiếp xúc nghề với bụi thuốc trong quá trình sản xuất. Khói và bụi thuốc lá sinh ra trong quá trình sản xuất chứa trên 40 chất có khả năng gây ung thư như nicotine, carbon monoxide, các hợp chất vòng thơm..., trong đó nicotine là thành phần chính gây hại đến sức khỏe con người; nó là chất gây độc thần kinh rất mạnh, gây ảnh hưởng đến da, phổi, tim mạch [4].

Nhiễm độc nicotine được công nhận là bệnh nghề nghiệp được bảo hiểm tại Việt Nam. Xét nghiệm nicotine hoặc cotinine niệu là hai chỉ số cận lâm sàng để đánh giá và thẩm định có nhiễm độc nicotine nghề nghiệp hay không (Thông tư số 12/2006/TT-BYT). Có nhiều phương

* Liên hệ: huybuivan@yahoo.com

pháp (kỹ thuật) phân tích khác nhau để xác định nicotine và cotinine niệu: phương pháp chưng cất bằng lôi cuốn hơi nước và phân tích trên máy quang phổ hấp thụ phân tử (so màu) [3]; phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector quang phổ tử ngoại (UV) [6],[11]; sử dụng kỹ thuật vi chiết pha rắn kết hợp với giải hấp nhiệt (HS/SPME) và phân tích trên hệ thống GC/MS [7]; kỹ thuật chiết lỏng – lỏng và phân tích trên máy sắc ký khí với detector nito phốt pho[8] hoặc detector khối phổ (MS)[9], [10]; phương pháp sắc ký lỏng hai lần khối phổ (LS/MS/MS) cũng đã được nghiên cứu và ứng dụng để xác định nicotine và các hợp chất chuyển hóa của nó trong mẫu nicotine niệu [5].

Hiện nay, tại Việt Nam vẫn chưa có tiêu chuẩn hay thông tư hướng dẫn nào của cơ quan có thẩm quyền quy định về việc xét nghiệm nicotine hoặc cotinine niệu ứng dụng trong việc khám và giám định bệnh nhiễm độc nicotine nghề nghiệp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ứng dụng và phát triển phương pháp xác định nicotine niệu bằng kỹ thuật chiết lỏng– lỏng kết hợp với phương pháp phân tích sắc ký khí khối phổ (GC/MS) để xác định nồng độ nicotine niệu của công nhân có hút và không hút thuốc lá, từ đó đánh giá tình hình phơi nhiễm nicotine của công nhân làm việc trong nhà máy sản xuất thuốc lá.

2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1 Đối tượng và địa điểm nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mẫu nước tiểu của công nhân làm việc trong công ty sản xuất thuốc lá trên địa bàn tỉnh Khánh Hòa (Việt Nam).

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Y học lao động và Bệnh nghề nghiệp Viện Pasteur Nha Trang từ tháng 6 năm 2015 đến tháng 6 năm 2016.

2.2 Thiết bị và hóa chất

Các dung môi và dung dịch chuẩn, nội chuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này là các hóa chất loại tinh khiết dùng trong phân tích sắc ký gồm hexan, dichloromethane, methanol, toluene, và acetic acid của Merk (Đức); nicotine, diphenylamine và quinoline của Sigma-Aldrich (Mỹ).

Hệ thống máy phân tích sắc ký khí khối phổ (GC/MS) của Agilent (GC-6890 và MS 5973) gồm cột HP-5MS với chiều dài 30m, đường kính trong 0,25mm, chiều dày lớp pha tĩnh 0,25 μm . Điều kiện phân tích: nhiệt độ buồng tiêm mẫu 225 $^{\circ}\text{C}$, thể tích tiêm mẫu 1 μL , chế độ tiêm mẫu không chia dòng, chương trình nhiệt độ 60 $^{\circ}\text{C}$ giữ 0 phút, gia nhiệt 20 $^{\circ}\text{C}$ /phút từ 60 $^{\circ}\text{C}$ đến 240 $^{\circ}\text{C}$ giữ 0 phút và chạy làm sạch cột tại nhiệt độ 280 $^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 5 phút.

Điều kiện làm việc của thiết bị khối phổ: nguồn ion hóa EI (Ion hóa trên cơ sở bắn phá điện tử); nhiệt độ nguồn ion hóa: 230 $^{\circ}\text{C}$; nhiệt độ interface: 280 $^{\circ}\text{C}$; thời gian cắt dung môi: 3,5

phút; hiệu thế detector: 1,35 kV; chế độ phân tích lựa chọn mảnh (SIM): nicotine (84), quinoline (129), diphenylamine (169).

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Quy trình thu mẫu: tất cả các mẫu nước tiểu của công nhân bắt đầu từ ca làm việc hôm trước cho đến ca làm việc của ngày tiếp theo (24 giờ) được thu vào chai nhựa (PE), sau đó đưa về phòng thí nghiệm, trộn đều mẫu của riêng từng người sau đó lấy một phần thể tích khoảng 25mL bảo quản tại nhiệt độ -20°C cho đến khi phân tích.

Quy trình phân tích: hút chính xác 1mL mẫu cho vào ống nghiệm thủy tinh đã rửa sạch, thêm vào 500 μL dung dịch đệm pH = 13 (NaOH/NaCl) và 100 μL dung dịch nội chuẩn diphenylamine nồng độ 2 mg/L. Lắc trong vòng 1 phút để trộn đều mẫu, sau đó cho tiếp 3mL hỗn hợp dung môi chiết (dichloromethane – hexane, 1:1 v/v), tiến hành lắc trong vòng 15 phút với tốc độ 15000 vòng/phút. Tách chiết phần dung môi sang một 1 ống nghiệm ly tâm thủy tinh mới chứa sẵn 10 μL acetic acid băng. Phần dung dịch được chiết tiếp lần 2 bằng 2mL hỗn hợp dung môi chiết theo quy trình như đã trình bày. Gộp các pha hữu cơ, ly tâm, làm khan dung môi và cô cho đến cạn bằng dòng khí nitơ. Hòa tan lại dịch chiết bằng 1mL dung môi toluene chứa quinoline nồng độ 100ppb và phân tích trên GC/MS. Thể tích 1 μL mẫu đưa vào phân tích GC/MS.

Xây dựng đường chuẩn: chuẩn bị dãy chuẩn làm việc gồm 6 dung dịch có nồng độ 0,010mg/L; 0,020mg/L; 0,050mg/L; 0,100 mg/L; 0,200 mg/L và 0,300 mg/L; nồng độ dung dịch nội chuẩn là 0,200 mg/L. Tiến hành phân tích trên thiết bị GC/MS theo các điều kiện tối ưu đã khảo sát.

Giản đồ phổ SCAN, phổ khối lượng và phổ chọn lọc ion (SIM) của nicotine, quinoline và diphenylamine được miêu tả trong hình 1 và hình 2.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Xây dựng các chỉ số thẩm định phương pháp

Đường chuẩn

Đường chuẩn để tính hàm lượng nicotine:

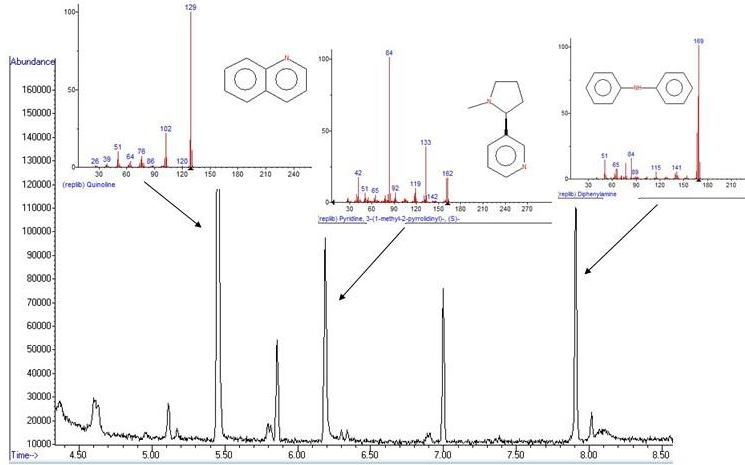
$$Y = (0,00168 \pm 0,00004) \cdot X - (0,01684 \pm 0,00616); R^2 = 0,9977$$

trong đó, X là nồng độ chất chuẩn nicotine (mg/L), Y là tỉ lệ tín hiệu giữa chiều cao peak của nicotine và chất nội chuẩn (diphenylamine), R là hệ số tương quan.

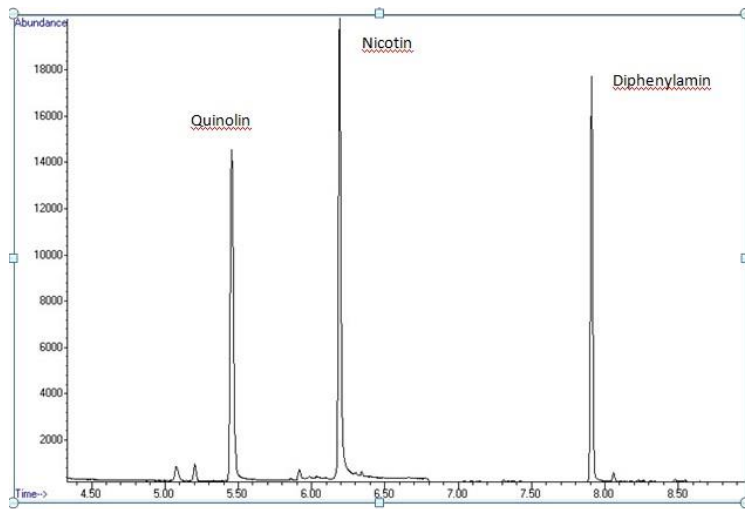
Đường chuẩn để tính hiệu suất thu hồi mẫu:

$$Y = (0,00621 \pm 0,00004) \cdot X - (0,02263 \pm 0,00649); R^2 = 0,9998$$

trong đó X là nồng độ chất xác định hiệu suất thu hồi, quinoline (mg/L), Y là tỉ lệ tín hiệu giữa chiều cao peak của quinoline và chất nội chuẩn (diphenylamine), R là hệ số tương quan.



Hình 1. Giải đồ phổ SCAN và khối lượng của nicotine, quinoline và diphenylamine



Hình 2. Giải đồ phổ chọn lọc ion (SIM): nicotine (84), quinoline (129) và diphenylamine (169)

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Chuẩn bị mẫu nước tiểu có nồng độ nicotine nằm trong khoảng LOD ước lượng, tiến hành phân tích lặp lại 10 lần và tính nồng độ nicotine theo đường chuẩn đã xây dựng thu được kết quả miêu tả trong Bảng 1.

Đánh giá LOD thông qua việc lập tỉ số $R = X_{tb}/LOD$ [2]

Nếu $4 < R < 10$ thì nồng độ dung dịch thử là phù hợp và LOD tính được là đáng tin cậy. Nếu $R < 4$ thì phải dùng dung dịch thử đậm đặc hơn. Nếu $R > 10$ thì phải dùng dung dịch thử loãng hơn. Kết quả khảo sát với mẫu thử đã chọn cho thấy $R = 4,65$; như vậy mẫu thử đã chọn có nồng độ phù hợp và giá trị LOD tính được là đáng tin cậy.

Bảng 1. Kết quả xác định LOD và LOQ

STT	Lần khảo sát	Tín hiệu đo/chiều cao peak (AU)*		Nồng độ nicotine (mg/L)
		Nicotine	Nội chuẩn	
1	Lần 1	103	10338	0,0085
2	Lần 2	106	10403	0,0087
3	Lần 3	118	10302	0,0097
4	Lần 4	110	10733	0,0087
5	Lần 5	118	10401	0,0097
6	Lần 6	100	10191	0,0084
7	Lần 7	114	10305	0,0094
8	Lần 8	116	10269	0,0096
9	Lần 9	118	10606	0,0095
10	Lần 10	125	10232	0,0104
Trung bình (X_{tb})				0,0093
Độ lệch chuẩn (SD)				0,0007
$LOD (3 \times SD)$				0,0020
$LOQ (10 \times SD)$				0,0066

*AU: Abundance Unit

Độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp

Để xác định hiệu suất thu hồi cũng như độ lặp lại của phương pháp, chúng tôi sử dụng mẫu thực thêm chuẩn ở các cấp nồng độ 0,100 mg/L và 0,300 mg/L. Sau đó, thực hiện quy trình phân tích đã lựa chọn và tiến hành phân tích lặp lại 6 lần; kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Độ thu hồi và độ lệch chuẩn tương đối (RSD) khi phân tích lặp lại nicotine ở cấp nồng độ 0,100 mg/L và 0,300 mg/L

Hợp chất/ Tiêu chuẩn	Nồng độ (mg/L)	Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) (%)	Hiệu suất thu hồi (%)
Nicotine	0,100	9,7	90,7 (79,7–105,3)
	0,300	6,5	98,8 (80,2–109)
AOAC**	0,010	21	60 – 115
	0,100	15	80 – 110
	1,000	11	80 – 110

** Hiệp hội các nhà Hóa học Phân tích – Association of Official Analytical Chemists

Kết quả phân tích hàm lượng nicotine niệu của công nhân

Ứng dụng phương pháp phân tích đã xây dựng để phân tích hàm lượng nicotine niệu của công nhân làm việc trong nhà máy sản xuất thuốc lá; kết quả được miêu tả trong Bảng 3.

Bảng 3. Hàm lượng nicotine niệu của công nhân có hút thuốc lá và không hút thuốc lá

Số lượng công nhân	Nồng độ nicotine niệu (mg/L)			Tiêu chuẩn đánh giá	
	Nhỏ nhất	Lớn nhất	Trung bình	TT:12/2006/ TT-BYT	Số mẫu vượt tiêu chuẩn
Không hút thuốc lá ($n = 423$)	Không phát hiện (<LOD)	1,550	$0,047 \pm 0,150$	< 0,3	14
Có hút thuốc lá ($n = 124$)	0,013	3,324	$0,623 \pm 0,641$	< 1,2	22

Trong 547 mẫu nước tiểu của công nhân được tiến hành phân tích trong năm 2015, chúng tôi nhận thấy ở nhóm công nhân không hút thuốc lá, hàm lượng nicotine niệu có giá trị trung bình khoảng ($0,047 \pm 0,150$) mg/L, trong đó có 75 mẫu không phát hiện (nhỏ hơn giới hạn của phương pháp) và 14 mẫu có hàm lượng nicotine vượt ngưỡng theo tiêu chuẩn giám định bệnh

ngành nghiệp (TT:12/2006/TT-BYT).Đề nghị khám thêm tại các chuyên khoa lâm sàng khác để khẳng định những công nhân này có bị mắc bệnh nhiễm độc nicotine nghề nghiệp hay không. Đối với nhóm công nhân có hút thuốc lá, hàm lượng nicotine niệu trung bình khoảng $(0,623 \pm 0,641)$ mg/L và số mẫu vượt ngưỡng theo tiêu chuẩn giám định là 22.

Nghiên cứu quy trình xử lý mẫu để định lượng nicotine niệu đã được nhiều tác giả nghiên cứu trước đây [7], [5], [9]. Trong nghiên cứu của Massadeh và cộng sự [10], khâu xử lý mẫu được tác giả tiến hành chỉ 1 lần tách chiết và thể tích hòa tan mẫu sau cùng là 100 μ L. Khi ứng dụng đúng kỹ thuật này vào thực tiễn tại phòng thí nghiệm cho nhiều đối tượng thực hiện, chúng tôi nhận thấy không kiểm soát được độ lặp lại của quá trình tách chiết. Mặc dù thể tích hòa tan mẫu nhỏ (100 μ L) giúp làm tăng độ nhạy của tín hiệu đo, nhưng do không sử dụng chất để đánh giá hiệu suất thu hồi mẫu nên không thể kiểm soát được hiệu suất thu hồi của quá trình tách chiết (vì độ nhạy của tín hiệu đo có sự thay đổi theo thời gian). Để khắc phục vấn đề nêu trên và xây dựng phương pháp có thể ứng dụng cho nhiều phòng thí nghiệm cũng như giúp cán bộ quản lý phòng thí nghiệm kiểm soát được kết quả đo, chúng tôi chọn kỹ thuật chiết lỏng – lỏng với thể tích mẫu ban đầu 1 mL, chiết 3 lần, lần đầu 3 mL và hai lần sau mỗi lần 2 mL dung môi, thể tích định mức sau khi cô và tinh chế mẫu là 1 mL có chứa chất tính hiệu suất thu hồi nồng độ 100 ppb. Kết quả cho thấy độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần phân tích lặp lại đạt từ 6,5 % đến 9,7 % và hiệu suất thu hồi đạt từ 80 % đến 109 %.

Khi khảo sát hệ số đáp ứng (là tỉ số giữa tín hiệu đo của chất phân tích với nồng độ của nó trên cùng một thiết bị đo [12]) của từng hợp chất riêng lẻ (nicotine và diphenylamine), chúng tôi nhận thấy tín hiệu đo tỉ lệ tuyến tính với nồng độ của chất phân tích trong khoảng nồng độ 0,010 mg/L đến 2,000 mg/L. Tuy nhiên, khi khảo sát hệ số đáp ứng đồng thời của chất phân tích và nội chuẩn trong cùng 1 mẫu trên detector khối phổ, chúng tôi nhận thấy hệ số đáp ứng có sự thay đổi khi nồng độ chất phân tích lớn hơn 0,300 mg/L. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn khoảng nồng độ tuyến tính từ 0,010 mg/L đến 0,300 mg/L để tiến hành phân tích định lượng. Với những mẫu phân tích có nồng độ lớn hơn 0,300 mg/L, tiến hành pha loãng mẫu để nồng độ nicotine giá trị nằm trong vùng tuyến tính đã khảo sát. Trong các nghiên cứu của Massadeh và cộng sự [10], chúng tôi không thấy số liệu khảo sát về hệ số đáp ứng, vì vậy khoảng nồng độ tuyến tính tương ứng trong các nghiên cứu này có giá trị rộng hơn so với kết quả nghiên cứu này.

Hiệu suất thu hồi của phương pháp xây dựng đạt từ 80 % đến 109 %; giá trị này nằm trong khoảng tiêu chuẩn cho phép theo AOAC khi phân tích ở cấp hàm lượng phần triệu (ppb). Kết quả nghiên cứu này tương tự như kết quả nghiên cứu của Massadeh và cộng sự phát triển trên cùng phương pháp [10]. Độ lặp lại của phương pháp cũng thu được kết quả đáp ứng theo yêu cầu của AOAC, với RSD nằm trong khoảng 3,7–9,7 %.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chưa đánh giá các mối tương quan như nồng độ nicotine trong môi trường không khí, điều kiện môi trường lao động, thâm niên và vị trí công tác cũng như số lượng thuốc hút trên ngày và thời gian đã hút với nồng độ nicotine niệu trên từng nhóm đối tượng. Tuy nhiên, chúng tôi đã bước đầu xây dựng thành công phương pháp phân tích đáp ứng

theo yêu cầu của AOAC để xác định hàm lượng nicotine niệu của công nhân làm việc trong công ty sản xuất thuốc lá với hai nhóm đối tượng là có hút thuốc lá và không hút thuốc lá. Kết quả của nghiên cứu còn cho thấy có 3,3 % số công nhân có hàm lượng nicotine vượt ngưỡng tiêu chuẩn cho phép với nhóm đối tượng không hút thuốc lá và 17,7 % đối với nhóm đối tượng có hút thuốc lá. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Trúc Ly và cộng sự [1] khi khảo sát hàm lượng nicotine niệu của công nhân trong nhà máy thuốc lá tại khu vực thành phố Hồ Chí Minh cũng chỉ ra rằng có sự phơi nhiễm nicotine đối với công nhân làm việc trong môi trường này và tuổi nghề cứ tăng lên 1 năm thì nguy cơ bị theo dõi nicotine tăng lên 1,04 lần. Thời gian hút thuốc cứ tăng lên một năm thì nguy cơ bị theo dõi nhiễm nicotine tăng lên 1,09 lần.

4 Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy phương pháp chiết lỏng – lỏng và phân tích trên thiết bị sắc ký khí khối phổ có thể ứng dụng để định lượng nicotine niệu ở cấp hàm lượng thấp với LOQ (6,6ppb), hiệu suất thu hồi đạt từ 80 % 109 % đáp ứng tiêu chuẩn cho phép theo Hiệp hội các nhà hóa học phân tích (AOAC).

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thị Trúc Ly, Phan Bích Hà, Trần Thị Kiều Anh (2012), Khảo sát hàm lượng Nicotin niệu của công nhân trong nhà máy thuốc lá tại thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*, Tập 16 (số 3), Tr. 373.
2. Trần Cao Sơn (2010), *Thẩm định phương pháp trong phân tích hóa học và vi sinh vật*, Nxb.Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
3. Lê Văn Trung (2002), *Thường Quy kỹ thuật Y học Lao Động và Vệ Sinh Môi Trường*, Nxb.Y học, Hà Nội.
4. Bùi Thị Kiều Trang (2011), *Đánh giá mức độ ô nhiễm nicotin trong môi trường không khí và tác động của nó đến sức khỏe người lao động*, Luận văn Thạc sĩ, chuyên ngành Khoa học Môi trường, Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên TP. HCM,
5. Zhong Fan, Fuwei Xie, Qiaoling Xia, Sheng Wang, Li Ding, Huimin Liu (2008), Simultaneous Determination of Nicotine and Its Nine Metabolites in Human Urine by LC–MS–MS. *Chromatographia*, 68 (7), 623–627.
6. Michael Horstmann (1985), Simple high-performance liquid chromatographic method for rapid determination of nicotine and cotinine in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 344, 391–396.
7. Karaconji, Irena Brcic, Skender, Ljiljana, Karacic, Visnja (2007), Determination of Nicotine and Cotinine in Urine by Headspace Solid phase Microextraction Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *Acta Chimica Slovenica*, 54 (1), 74–78.
8. Lusiane Malafatti, Patrícia Penido Maia, Matheus Coutinho Gonçalves Martins, Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, Isarita Martins (2010), Single gas chromatography method with nitrogen phospho-

- rus detector for urinary cotinine determination in passive and active smokers. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46 (4), 769–776.
9. Che Nin Man, Lay-Harn Gam, Syazwani Ismail, Razak Lajis, Rahmat Awang (2006), Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 844 (2), 322–327.
 10. Adnan M. Massadeh, Ahmad A. Gharaibeh, Khaled W. Omari (2009), A Single-Step Extraction Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian Smokers' Blood and Urine Samples by RP-HPLC and GC–MS. *Journal of Chromatographic Science*, Vol. 47 (2), 170–177.
 11. YEN-HSIA WEN, PEI-SHIN YANG, SHIH-SHENG WU (2009), Determination of Cotinine in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17 (5), 357–362.
 12. <https://www.chromatographytoday.com/news/gc-mdgc/32/breaking-news/what-is-a-response-factor/31169>.
 13. <http://www.who.int/gho/tobacco/use/en/>.

DETERMINATION OF NICOTINE IN TOBACCO WORKER'S URINE USING LIQUID-LIQUID EXTRACTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (GC-MS)

Bui Van Huy^{1*}, Le Vu Dang Giao¹, Truong Quy Tung²

¹Nha Trang Pasteur Institute, 08 Tran Phu street, Nha Trang city, Khanh Hoa province, Viet Nam

²Hue University, 03 Le Loi street, Hue city, Viet Nam

Abstract: Nicotine concentration in urine is one of the key (critical) subclinical indices to estimate the exposure levels, as well as to appraise thenicotine-poisoning occupational disease. The determination of nicotine has been performed using techniques such as ultraviolet-visible spectrophotometry and solid-phase extraction with GC/MS; however, the recoveries and the repeatability were relatively low. Therefore, a liquid-liquid extraction method combined with gas-chromatography-mass-spectrometry has been developed for the determination of nicotine in the urine sample of workers of tobacco factories. Nicotine was extracted with a dichloromethane-hexane mixture (1:1 v/v) in an alkaline solution. The organic phase was evaporated under a stream of nitrogen gas until dryness, then reconstituted to 1 mL with toluene and analyzed using a GC/MS system. This has been considered as a high-reliability and high-sensitivity method with the limit of detection 2.0 µg/L, from 80 % to 109 % of recovery performance of the sample, and repeatability from 4.6 % to 9.7 %. The results of this study showed that the ranges of nicotine concentration in the urine sample of smoking and non-smoking workers of the tobacco factories were 0.013 mg/L–3.324 mg/L ($n = 124$) and 0.006 mg/L–1.550 mg/L ($n = 423$), respectively.

Keywords: Liquid-liquid extraction, nicotine, urine, GC/MS