

Wojciech PIEKOSZEWSKI¹
Ewa FLOREK²
Maksymilian KULZA²
Jolanta WILIMOWSKA³
Urszula LOBA²

Opracowanie metody oznaczania metabolitów nikotyny w moczu

Development of analytical method for determination nicotine metabolites in urine

¹Zakład Chemii Analitycznej,
Uniwersytet Jagielloński, Kraków
Kierownik: Prof. dr hab. *Paweł Kościelniak*

²Laboratorium Badań Środowiskowych,
Katedra i Zakład Toksykologii,
Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego, Poznań
Kierownik Laboratorium:
Prof. dr hab. *Ewa Florek*

³Pracownia Toksykologii Analitycznej i Terapii
Monitorowanej, Katedra Toksykologii i Chorób
Środowiskowych, Collegium Medicum
Uniwersytet Jagielloński, Kraków
Kierownik Pracowni: Dr *Ewa Gomółka*

Dodatkowe słowa kluczowe:

nikotyna
metabolity nikotyny
mocz

Additional key words:

nicotine
nicotine metabolites
urine

Najpopularniejszą i najbardziej wiarygodną metodą w ocenie narażenia na dym tytoniowy jest oznaczanie biomarkerów w materiale biologicznym. Do najbardziej specyficznych biomarkerów dla dymu tytoniowego zalicza się nikotynę i jej metabolity. Obecnie najczęściej wykorzystywana jest kotynina i trans-3'-hydroksykotynina. Celem pracy było opracowanie prostej i szybkiej metody oznaczania nikotyny i jej pięciu głównych metabolitów z zastosowaniem dostępnej w większości laboratoriów metody HPLC. Nikotynę i jej metabolity w moczu (kotyninę, trans-3'-hydroksykotyninę, nornikotynę, N-tlenek nikotyny, N-tlenek kotyniny) oznaczono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV). Analiza chromatograficzna została poprzedzona ekstrakcją badanych związków z moczu z wykorzystaniem techniki ciecz-ciecz. Opracowana technika HPLC okazała się metodą przydatną do oznaczania nikotyny i jej czterech metabolitów u osób palących tytoń. Nie mniej konieczne są dalsze badania nad powyższą metodą. Wymagana jest dalsza modyfikacja procedury, ze względu na interferencje N-tlenku kotyniny z tłem biologicznym moczu, co uniemożliwia jego oznaczanie. Zwiększenie wydajności ekstrakcji nikotyny i nornikotyny umożliwiłoby ich oznaczenie również u osób narażonych na środowiskowy dym tytoniowy (ETS). Powyższe badania potwierdzają doniesienia innych autorów, że trans-3'-hydroksykotynina może być równorzędny z kotyniną miernikiem narażenia na dym tytoniowy, wymaga to jednak dalszych analiz.

Wstęp

Obecność nikotyny lub jej metabolitów w płynach biologicznych czy tkankach jest specyficznym miernikiem narażenia organizmu na działanie dymu tytoniowego, a tym samym wszystkich zawartych w nim substancji toksycznych. Pomiar zawartości nikotyny i jej pochodnych w płynach ustrojowych jest najbardziej czułym markerem tej ekspozycji.

W ocenie narażenia na działanie dymu

The assay of biomarkers in biological material is the most popular and reliable method in estimate exposure to tobacco smoke. Nicotine and its metabolites qualify to the most specific biomarkers for tobacco smoke. Currently the most often used are cotinine and trans-3'-hydroxycotinine. The aim of this study was development of easy and quick method of determining nicotine and its main metabolites with high performance liquid chromatography - available in most laboratories. Nicotine and its metabolites in urine (cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, nornicotine and nicotine N-oxide) was determined by means of high performance liquid chromatography with spectrometry detection (HPLC-UV). The determined compounds were extracted from urine by means of the liquid-liquid technique, before analysed by the HPLC method. Developed technique of high performance liquid chromatography proved to be useful to assessment nicotine and its four metabolites in smokers, though further research are necessary. The further modification of procedure is required, because of the interferences of cotinine N-oxide with matrix, which prevent determination. Increasing the efficiency of extraction nicotine and nornicotine could enable the determination in people exposed on environmental tobacco smoke (ETS). This study confirm other authors' observations that 3'-hydroxycotinine might be equivalent with cotinine predictor of tobacco smoke exposure, however further studies are required.

tytoniowego główną rolę odgrywa kotynina - najważniejszy ilościowo i jeden z najbardziej stabilnych produktów metabolizmu nikotyny. Jej stężenie jest wprost proporcjonalne do ilości wchłanianej nikotyny, szybkości jej metabolizowania i szybkości eliminowania z krążenia [18].

Wśród metod stosowanych do oznaczania nikotyny i jej metabolitów wymienić należy chromatografię gazową i cieczową oraz metody immunologiczne.

Adres do korespondencji:
Prof. dr hab. Wojciech Piekoszewski
Zakład Chemii Analitycznej
Uniwersytet Jagielloński
30-060 Kraków, ul. R. Ingardena 3
Tel. (+12) 663 20 45
Fax. (+12) 634 05 15
e-mail: wpiekosz@tlen.pl

Chromatografia gazowa szczególnie sprzężona ze spektrometrią mas jest przydatną metodą w analizie nikotyny i jej metabolitów. Do tej pozycji przyczyniły się przede wszystkim niskie granice detekcji rzędu piko-, a nawet femtomogramów oraz możliwości zastosowania wysokorozdzielczych kolumn i różnych detektorów [10]. Dużą zaletą tej metody jest możliwość równoczesnego oznaczania metabolitów, np. nikotyny i kotyniny, bądź kotyniny łącznie z 3'-hydroksykotyniną.

Do wad metody należy skomplikowana procedura przygotowania próbki badanej i eksponowanie analitów na stosunkowo wysokie temperatury, co może przyczynić się do rozkładu cząstek o charakterze polarnym.

Metodą chromatografii gazowej z spektrometrem mas jako detektorem przeprowadzono jednoczesną analizę nikotyny i kotyniny w moczu [9]. W badaniu wykorzystano system Toxi-Lab, co ułatwiło i przyspieszyło proces wstępnej ekstrakcji.

Metoda HPLC została wykorzystana do oceny narażenia na ETS przez *Harlharana* w 1988 roku. Umożliwiała ona jednoczesne oznaczanie nikotyny i kotyniny w osoczu [8]. Zaznaczono wyższość tej metody nad dotychczas stosowaną chromatografią gazową, która, pomimo dobrych parametrów rozdzielczości oznaczanej mieszaniny, wykazuje ograniczoną stabilność detektora oraz samej kolumny kapilarnej. Jednocześnie zmodyfikowano metodę HPLC pod kątem rutynowej analizy jednocześnie dwóch analitów w małej objętości ludzkiego osocza (1 ml). W tym celu jako rozpuszczalnik wykorzystano chlorek metylenu, który pozwolił na efektywniejszą ekstrakcję metabolitów z osocza oraz uniknięcie formowania emulsji, co utrudniałoby późniejsze oznaczenie. Wykazano liniowość metody w zakresie stężeń 0-700 ng/ml, uzyskane wyniki mieściły się w granicach 5-48 ng/ml dla nikotyny i 180-460 ng/ml dla kotyniny.

W 2002 roku stosując chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas oznaczono jednocześnie pięć analitów w surowicy i moczu [13]. Metodę tę zastosowano do oznaczania nikotyny i jej metabolitów: kotyniny, 3'-hydroksykotyniny, normikotyny oraz anabazyny - alkaloidu obecnego w tytoniu. Zaletą tej modyfikacji było zwiększenie czułości i specyficzności metody. Granice oznaczalności wynosiły: dla nikotyny i normikotyny 2 ng/ml, dla anabazyny i kotyniny 1 µg/ml oraz dla 3'-hydroksykotyniny 5 ng/ml. Badanie pozwoliło rozróżnić osoby, które nie były narażone na ETS od osób będących biernymi palaczami, od byłych aktywnych palaczy lub też od osób aktywnie palących czy stosujących nikotynową terapię zastępczą.

Za pomocą testu radioimmunologicznego możliwe jest oznaczenie stężenia metabolitów nikotyny w takim materiale jak osocze, surowica, ślina, mocz, płyn mózgoworodzeniowy oraz, coraz szerzej wykorzystywane, włosy [7].

W porównaniu z RIA metody enzymoimmunologiczne wykazują szersze zastosowanie. Przyczynia się do tego niższa selektywność metody RIA, na wyniki której wpływa obecność trans-3'-hydroksykotyni-

ny w moczu i krwi [16]. ELISA charakteryzuje się dużą dokładnością, czułością i specyficznością, co zostało potwierdzone w porównaniu z referencyjną metodą wysokosprawną chromatografią cieczową. Analiza porównawcza metody HPLC z detekcją spektrofotometryczną po uprzedniej ekstrakcji typu ciecz-ciecz oraz metodą ELISA przy użyciu bezpośredniego testu *Cotinine Direct Elisa* (BioQuant, USA) wykazała wysoki współczynnik korelacji $r = 0,9056$ pomiędzy wynikami oznaczenia kotyniny w moczu obiema metodami, co potwierdziło przydatność metody enzymoimmunologicznej w ocenie narażenia na dym tytoniowy.

Obok moczu, jako matrycę biologiczną stosuje się również surowicę. *Ziegler* w swoich badaniach oceny narażenia na dym tytoniowy przy użyciu testu ELISA wykorzystał oba powyższe materiały [23]. Wykazano bardzo dobrą czułość, precyzję i odtwarzalność kotyniny w tej analizie. Przedstawiono istotne rozgraniczenie pomiędzy osobami palącymi, biernymi palaczami a osobami niepalącymi na dym w przypadku oznaczania moczu. Dla analizy surowicy kotynina jest doskonałym biomarkerem do rozróżniania aktywnych palaczy od osób niepalących/biernych palaczy. Moczu surowica ukazują przekonujące i porównywalne rezultaty oceny narażenia na ETS.

Celem pracy było opracowanie prostej i szybkiej metody oznaczania nikotyny i jej pięciu głównych metabolitów z zastosowaniem dostępnej w większości laboratoriów metody HPLC.

Material i metody

Odczynniki

Do badań użyto dichlorometanu do HPLC (Sigma), metanol do HPLC (Sigma), kotyninę standard 1 mg/ml (Sigma), kwas fosforowy stęż. (Sigma), kwas solny cz.d.a (roztwór 35 mM w metanolu) (Sigma), oraz wodę dejonizowaną (Sigma), oktanosulfonian sodu, 1,1 g/l (Fluka) i wzorce metabolitów: nikotyna, trans-3'-hydroksykotynina, normikotyna, N-tlenek nikotyny, N-tlenek kotyniny (Toronto Research Chemicals Inc.).

Aparatura

W badaniach wykorzystano wysokosprawną chromatograf cieczową CRYSTAL 200 (ATI Unicam) z dozownikiem Rheodyne 7125 z pętlą dozującą pojemności 100 µl i detektorem spektrofotometrycznym UV-vis.

Wykonanie oznaczeń

Ekstrakcję i rozdział chromatograficzny prowadzono wcześniej opracowaną metodą do oznaczeń kotyniny z modyfikacją polegającą na zrezygnowaniu z wzorca wewnętrznego, a obliczenia dokonywano w oparciu o pole pod otrzymanymi pikami.

Ekstrakcję badanych metabolitów za pomocą 5 ml dichlorometanu prowadzono z jednego mililitra moczu badanego lub moczu, do którego dodano nikotynę i jej metabolity (kotyninę, trans-3'-hydroksykotyninę, normikotynę, N-tlenek nikotyny i N-tlenek kotyniny) w stężeniu podanym w rozdziale Wyniki z dodatkiem 0,1 ml 1 M roztworu wodorotlenku sodu w celu uzyskania pH=9. Próbkę wytrząsano na Vortexie przez 15 sekund, a następnie dodano 5 ml dichlorometanu i ekstrahowano przez 15 minut. Próbkę wirowano 10 minut przy obrotach 3000/min., a następnie pobrano 4 ml fazy organicznej i przeniesiono do probówek stożkowych, dodano 100 µl 35 mM kwasu solnego w metanolu i odparowywano do sucha w strumieniu powietrza, w temperaturze 40°C. Suchą pozostałość rozpuszczono w 150 µl fazy ruchomej.

Do rozdziału badanych związków zastosowano pre-kolumnę (3 cm) i kolumnę (25 cm) do chromatografii cieczowej Supelcosil LC-8 (Supelco). Faza ruchoma zawierała 88% wody, 12% acetonitrylu, 1 g/l oktanosulfonianu

sodu i 5,95 g/l wodorofosforanu potasu; pH fazy ruchomej ustalono na 5,5 stężonym kwasem fosforowym. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w warunkach izokratycznych. W czasie pracy chromatografu przepływ fazy był stały i wynosił 1 ml/min. Objętość dozowanej próbki wynosiła 100 µl. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali $\lambda = 260$ nm.

W ramach walidacji metody wyznaczono: czasy retencji badanych związków, limit wykrywalności i oznaczalności, powtarzalność w ciągu dnia i pomiędzy dniami oraz odzysk.

W celu potwierdzenia opracowanej metody do oznaczania nikotyny i jej metabolitów przeprowadzono ich oznaczenie w 4 próbach moczu pobranego od kobiet palących ponad 10 papierosów dziennie.

Wyniki

Rozdział chromatograficzny nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny

W pierwszym etapie badań podjęto próbę rozdzielania nikotyny i jej 5 metabolitów (kotynina, trans-3'-hydroksykotynina, normikotyna, N-tlenek nikotyny i N-tlenek kotyniny) z wykorzystaniem izokratycznej chromatografii cieczowej.

W wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem wzorców badanych związków rozpuszczonych w fazie ruchomej otrzymano wyniki przedstawione w tabeli I.

Otrzymane wyniki wskazują, że wszystkie badane związki ulegają rozdziałowi w opracowanych warunkach.

Jednak przeprowadzone badania z nikotyną i jej metabolitami dodanymi do moczu wykazały, że N-tlenek kotyniny nie ulega rozdziałowi od tła jakie powodują fizjologiczne składniki moczu.

Walidacja metody oznaczania nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny

Walidacja metody oznaczania nikotyny i jej metabolitów obejmowała określenie: liniowości metody, granicy wykrywalności (LOD), limitu oznaczalności (LOQ), powtarzalności w ciągu dnia i pomiędzy dniami oraz odzysku.

Zakres liniowości dla wszystkich badanych związków wynosił od 100 do 2000 ng badanych związków na ml moczu.

Opracowana metoda cechowała się granicą wykrywalności i oznaczalności dla poszczególnych związków, które przedstawiono w tabeli II.

Kolejnym wyznaczonym parametrem walidacyjnym opracowanej metody była powtarzalność w ciągu dnia. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli III.

We wszystkich przypadkach, z wyjątkiem normikotyny w niskich stężeniach współczynnik zmienności (CV) był poniżej 10%.

Wyniki określenia zmienności pomiędzy dniami zestawiono w tabeli IV.

Powtarzalność pomiędzy dniami była zbliżona do powtarzalności w ciągu dnia i w kilku przypadkach CV przekraczało 10%.

Ważnym elementem procesu walidacji jest określenie odzysku metody, który ma bezpośredni wpływ na jej czułość. W przypadku tej metody ekstrakcji odzysk metody był zróżnicowany dla poszczególnych związków.

Wyniki odzysku dla poszczególnych związków zebrano w tabeli V.

Oznaczanie nikotyny i jej metabolitów w

Tabela I

Czasy retencji nikotyny i ich metabolitów.

Retention times of nicotine and the metabolites.

Związek	Stężenie wzorców [μ g/ml]	Czas retencji [min.]
Nikotyna	10	22,16
Kotynina	1	9,27
Trans 3'-hydroksykotynina	1	5,66
Nomikotyna	0,2	19,78
N-tlenek nikotyny	1	8,44
N-tlenek kotyniny	0,5	3,77

Tabela II

Granice wykrywalności i oznaczalności nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny w moczu.

Low limit of detection (LOD) and low limit of quantification (LOQ) of nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, N-nicotine oxide and N-cotinine oxide.

Związek	LOD ng/ml]	LOQ [ng/ml]
Nikotyna	50	100
Kotynina	10	100
Trans-3'-hydroksykotynina	10	100
Nomikotyna	50	100
N-tlenek nikotyny	5	100
N-tlenek kotyniny	ND	ND

ND - metoda nie umożliwia oznaczania N-tlenku kotyniny

Tabela III

Powtarzalność wewnątrzgrupowa metody oznaczania nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny w moczu.

Inter-day precision of determination of: nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, N-nicotine oxide and N-cotinine oxide.

Parametr	Stężenie zadane [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	CV [%]
Nikotyna	250	243	6,2
	1500	1476	3,9
Kotynina	250	253	2,9
	1500	1537	4,1
Trans-3'-hydroksykotynina	250	231	9,4
	1500	1428	6,2
Nomikotyna	250	201	12,7
	1500	1603	9,9
N-tlenek nikotyny	250	237	4,8
	1500	1472	3,5
N-tlenek kotyniny	250	ND	ND
	1500	ND	ND

próbach rzeczywistych

W celu zweryfikowania przydatności opracowanej metody do oznaczeń nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny w materiale biologicznym przeprowadzono oznaczanie tych związków w moczu pobranym od pacjentów palących tytoń oraz niepalących i nienarażonych na dym.

W moczu pobranym od kobiet niepalących i nienarażonych na dym tytoniowy w środowisku nie stwierdzono obecności nikotyny ani jej metabolitów w stężeniach powyżej czułości metody.

Stężenia badanych związków wyznaczone w moczu kobiet palących ponad 10 papierosów dziennie przedstawiono w tabeli VI.

Przykładowy rozdział chromatograficzny nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny w moczu jednej z badanych pacjentek przedstawiono na rycinie 1.

Ze względu na dużą różnicę stężeń pomiędzy kotyniną, trans-3'-hydroksykotyniną i pozostałymi metabolitami koniecznym było przeprowadzenie oznaczeń prób bezpośrednio po ekstrakcji oraz po 5- lub 10-krotnym rozcieńczeniu.

Dyskusja

Nikotyna będąca głównym alkaloidem tytoniu występuje zarówno w głównym strumieniu dymu, jak i w bocznym, na który narażeni są bierni palacze. Oznaczanie nikotyny może być wykorzystywane do oceny

narażenia na składniki dymu tytoniowego, ale ze względu na jej krótki biologiczny okres półtrwania nie znalazło ono zastosowania w praktyce. Natomiast podstawowy metabolit nikotyny - kotynina, mająca biologiczny okres półtrwania około 17 godzin, jest najczęstszym biomarkerem aktywnego i biernego palenia [9,14,21]. Innym powszechnie stosowanym biomarkerem narażenia na dym tytoniowy jest trans-3'-hydroksykotynina [2,12,20]. Łączne oznaczanie nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny i ich glukuronianów odpowiada za 80% wchłoniętej nikotyny [3].

Do tej pory opracowano wiele metod pozwalających na oznaczenie nikotyny i jej metabolitów w różnym materiale biologicznym (mocz, krew, surowica, ślina). Najczęściej stosowaną techniką analityczną jest chromatografia z różnymi detektorami; spektrofotometrycznym, diodowym, a obecnie coraz częściej detektorem masowym. Obok metod HPLC również chromatografia gazowa, metody radioimmunologiczne i enzymoimmunologiczne znajdują zastosowanie w tego typu oznaczeniach [6]. Zasadnicze różnice pomiędzy tymi metodami dotyczą ich czułości, co wiąże się z możliwościami oznaczeń metabolitów w różnych materiałach. W przypadku surowicy czy śliny, w których związki te występują w niskich stężeniach koniecznym jest zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas, umożliwiającym oznaczenie ich w materiale biologicznym na poziomie 0,5-1 ng/ml [4,19]. W przypadku oznaczania nikotyny i jej metabolitów w moczu, w którym ich stężenie jest kilka, a nawet kilkaset razy wyższe, do oznaczeń można wykorzystać wysokosprawną chromatografię cieczową z detektorem spektrofotometrycznym.

W badaniach przeprowadzonych w 2006 roku [17] zwrócono uwagę na alternatywne źródło danych o narażeniu na działanie nikotyny. Autorzy postanowili porównać pobraną dawkę nikotyny poprzez 3 różne analizy: analizę filtra wypalonego papierosa z wykorzystaniem GC, oznaczanie poziomu kotyniny w ślinie oraz oznaczanie metabolitów nikotyny w 24-godzinnej próbce moczu za pomocą LC/MS-MS. Wykazano pozytywne strony wykorzystania filtrów papierosowych do oceny narażenia na dym tytoniowy. Jest to jedna z mniej inwazyjnych opcji pozyskiwania materiału do badań, która dostarcza informacji o stopniu indywidualnej ekspozycji na nikotynę. Istotnym jest, że nie zmienia codziennych nawyków związanych z paleniem tytoniu. Autorzy dowiedli, że wszystkie wyniki uzyskane trzema drogami znacząco ze sobą korelowały, najlepszą zaś korelację wykazywały metody: analiza filtra oraz analiza nikotyny w moczu i jej metabolitów (kotynina, 3-hydroksykotynina oraz odpowiednie glukuronidy). Podkreślono znaczenie analizy filtrów jako metody mało skomplikowanej i nieinwazyjnej, umożliwiającej polepszenie współpracy między osobami badanymi i badaczami w przyszłości.

Do tej pory metoda HPLC z detektorem UV-VIS lub DAD stosowana była do oznaczeń nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny i ich glukuronidów [1,11,15], lecz

Tabela IV

Powtarzalność pomiędzy dniami metody oznaczania nikotyny, kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny i N-tlenku kotyniny w moczu.

Intra-day precision of determination of: nicotine, cotinine, trans-3'-hydroxycotinine, N-nicotine oxide and N-cotinine oxide.

Parametr	Stężenie zadane [ng/ml]	Średnie stężenie oznaczone [ng/ml]	CV [%]
Nikotyna	250	231	11,3
	1500	1432	7,6
Kotynina	250	259	6,2
	1500	1597	6,5
Trans-3'-hydroksykotynina	250	226	12,5
	1500	1401	8,7
Normikotyna	250	197	15,8
	1500	1378	11,3
N-tlenek nikotyny	250	263	6,9
	1500	1582	9,9
N-tlenek kotyniny	250	ND	ND
	1500	ND	ND

Tabela V

Odzysk badanych związków z moczu.

Recovery of analytes from urine.

Związek	Stężenie [ng/ml standardu lub moczu]	Odzysk [%]
Nikotyna	10	43
Kotynina	1	87
Trans-3'-hydroksykotynina	1	71
Normikotyna	0,2	31
N-tlenek nikotyny	1	82
N-tlenek kotyniny	0,5	ND

Tabela VI

Stężenie nikotyny i jej metabolitów w moczu kobiet palących tytoń.

Concentration of nicotine and metabolites in urine of smoking women.

Pacjentka	Stężenie w moczu [ng/ml]					
	Nikotyna	Kotynina	Trans-3'-hydroksykotynina	Normikotyna	Tlenek nikotyny	Tlenek kotyniny
1	326	1176	4254	375	241	ND
2	567	722	522	129	737	ND
3	637	2224	2005	140	439	ND
4	850	1077	2298	115	212	ND

nie stosowano jej do oznaczania metabolitów nikotyny występujących w mniejszych ilościach, takich jak: normikotyna, N-tlenek nikotyny czy N-tlenek kotyniny.

W podjętych badaniach opracowano metodę HPLC z detektorem spektrofotometrycznym umożliwiającą oznaczenie nikotyny i jej czterech metabolitów w moczu osób palących tytoń.

Granica opracowanej metody wynosząca 100 ng/ml moczu, przy założeniu niektórych autorów, że u osób niepalących a narażonych na ETS stężenie kotyniny może osiągać 200 ng/ml [5] umożliwia wykorzystanie jej do oznaczania nikotyny i metabolitów u osób narażonych na wysokie stężenia nikotyny w powietrzu. Do oznaczenia metabolitów na niższym poziomie konieczne jest zastosowanie metody chromatograficznej sprzężonej ze spektrometrią mas, a szczególnie z tandemem spektrometrów masowych. Stosując tę metodę Moyer był

w stanie oznaczać metabolity nikotyny na poziomie 0,5-5 ng/ml [13].

Jeszcze niższe stężenia nikotyny i jej metabolitów (0,1-0,2 ng/ml z wyjątkiem nikotyny 1 mg/ml) oznaczył Xu opracowaną przez siebie metodą LC/MS-MS [22]. W przeciwieństwie do tej metody umożliwiającej rozdzielanie nikotyny i jej 5 metabolitów (kotynina, trans-3'-hydroksykotynina, normikotyna, N-tlenek nikotyny, N-tlenek kotyniny) w opracowanej metodzie własnej N-tlenek kotyniny był maskowany przez piki pochodzące od tła biologicznego moczu i mimo zmiany warunków rozdzielania z izokratycznego na gradientowe nie uzyskano całkowitego rozdzielania badanych związków.

Powtarzalność opracowanej metody w ciągu dnia była zadawalająca, współczynnik zmienności wynosił poniżej 10% i tylko w przypadku normikotyny w niskim stężeniu (250 ng/ml) był równy 12,7%. Podobne wyniki uzyskał Xu [22]. Również w badaniach

własnych, pomimo, że współczynnik zmienności dla nikotyny wynosił poniżej 10% to jednak był najgorszy ze wszystkich oznaczanych związków i wynosił 9,0%. Znacznie większe współczynniki zmienności w ciągu dnia, jak i pomiędzy dniami w wielu wypadkach przekraczające 10% uzyskał w swoich badaniach Moyer [13].

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano prostą metodę ekstrakcji cieczy za pomocą dichlorometanu ze środowiska zasadowego (pH=10). Próba zastąpienia dichlorometanu octanem etylu poprawiła wydajność ekstrakcji, ale zarazem zwiększyła interferencję badanych związków ze składnikami tła pochodzącymi od moczu.

Stosując ekstrakcję SPE z wykorzystaniem kolumnienek Oasis HLB, Xu uzyskał dla wszystkich badanych związków bardzo dobry odzysk przekraczający 70% z wyjątkiem normikotyny, dla której wynosił 60% [22]. W badaniach własnych odzysk był zbliżony dla kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny i N-tlenku nikotyny, ale około dwukrotnie mniejszy dla nikotyny i normikotyny. Podobnie niską wydajność dla nikotyny, poniżej 40% uzyskał stosując opracowaną przez siebie metodę ekstrakcji SPE Moyer, lecz w jego metodzie odzysk trans-3'-hydroksykotyniny był około dwukrotnie mniejszy niż w opracowanej metodzie [13].

Wadą opracowanej metody była konieczność dwukrotnej analizy ze względu na znaczne różnice pomiędzy stężeniami poszczególnych metabolitów. Kotynina i trans-3'-hydroksykotynina występują w znacznie wyższych stężeniach niż nikotyna i normikotyna.

Przydatność opracowanej metody sprawdzono oznaczając metabolity u pacjentów: 4 kobiet palących tytoń i 3 niepalących. U żadnej z badanych kobiet niepalących nie wykazano obecności nikotyny i jej metabolitów. Natomiast oznaczenia wykonane w moczu kobiet palących, co najmniej 10 papierosów dziennie wykazały obecność nikotyny i wszystkich badanych metabolitów tego alkaloidu. W badanych próbach w największych stężeniach występowała kotynina i trans-3'-hydroksykotynina. W dwóch próbach większe stężenie wykazano dla kotyniny, a dla dwóch innych - trans-3'-hydroksykotyniny. Pozostałe metabolity występowały w dwu do trzykrotnie niższym stężeniu niż kotynina i trans-3'-hydroksykotynina.

Przeprowadzone badania wykazały przydatność opracowanej metody do oznaczania nikotyny i jej metabolitów jakkolwiek wymaga dalszych badań w celu umożliwienia oznaczenia N-tlenku kotyniny i zwiększenia wydajności ekstrakcji.

Wnioski

1. Opracowana prosta i szybka metoda HPLC pozwala na oznaczanie nikotyny i jej czterech metabolitów (kotyniny, trans-3'-hydroksykotyniny, normikotyny, N-tlenku nikotyny) na poziomie występującym w moczu osób palących tytoń.

2. Metoda wymaga dalszych modyfikacji pozwalających na oznaczenie kolejnego metabolitu - N-tlenku kotyniny, który obecnie interferuje ze składnikami tła biologicznego moczu.

3. Zwiększenie wydajności ekstrakcji nikotyny i nornikotyny pozwoliłoby na oznaczenie tych metabolitów u osób narażonych na dym tytoniowy w środowisku (ETS).

Piśmiennictwo

1. **Baranowski J., Pochopień G., Baranowska I.:** Determination of nicotine, cotinine and caffeine in meconium using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1998, 707, 317.
2. **Benowitz N.L., Jacob III P.:** Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking; *Br. L. Clin. Pharmacol.* 2001, 51, 53.
3. **Benowitz N.L., Jacob P. 3rd, Fong I., Gupta S.:** Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 268, 296.
4. **Bentley M.C., Abrar M., Kelk M. et al.:** Validation of an assay for the determination of cotinine and 3-hydroxycotinine in human saliva using automated solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. B.* 1999, 723, 185.
5. **Dahlstrom A., Lundell B., Curvall M., Thapper L.:** Nicotine and Cotinine Concentrations in the Nursing Mother and Her Infant. *Acta Paediatr. Scand.* 1990, 79, 142.
6. **Davis R.A., Curvall M.:** Determination of nicotine and its metabolites in biological fluids: in vivo studies. [In:] Gorrod J.W., Jacob P. (eds.) *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites.* Amsterdam, Elsevier Science, 1999, 583.
7. **Dhar P.:** Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35, 155.
8. **Harlharan M., VanNoord T., Greden J.F.:** A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. *Clin. Chem.* 1988, 34, 724.
9. **Hutchinson J., Yousef T., Robert T.:** Rapid method for the simultaneous measurement of nicotine and cotinine in urine and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 1998, 708, 87.
10. **Jacqz-Aigrain E., Zhang D., Maillard G. et al.:** Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 2002, 109, 909.
11. **Kędziora H., Florek E., Piekoszewski W. i. wsp.:** Stężenie kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny oraz ich glukuronidów w moczu kobiet ciężarnych palących tytoń. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 740.
12. **Lerman C., Tyndale R., Patterson F. et al.:** Nicotine metabolite ratio predicts efficacy of transdermal nicotine for smoking cessation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006, 79, 600.
13. **Moyer T.P., Charlson J.R., Enger R.J. et al.:** Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry with clinically relevant metabolic profiles. *Clin. Chem.* 2002, 48, 1460.
14. **Naidong W., Shou W., Chen Y., Jiang X.:** Novel liquid chromatographic-tandem mass spectrometric methods using silica columns and aqueous-organic mobile phases for quantitative analysis of polar ionic analytes in biological fluids. *J. Chromatogr. B.* 2001, 754, 387.
15. **Nakajima M., Yamamoto T., Kuroiwa Y., Yokoi T.:** Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 2000, 742, 211.
16. **Stanek A., Piekoszewski W., Florek E. i. wsp.:** Zastosowanie metody enzymoimmunologicznej do oznaczania kotyniny w moczu; *Przegl. Lek.* 2007, 64, 734.
17. **St.Charles F.K., Krautter G.R., Dixon M., Mariner D.C.:** A comparison of nicotine dose estimates in smokers between filter analysis, salivary cotinine, and urinary excretion of nicotine metabolites. *Psycho-pharmacol.* 2006, 189, 345.
18. **Szymborski J., Laskowska-Klita T., Mazur J.:** Zdrowie naszych dzieci. Dzieciństwo wolne od tytoniu. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa, 2001.
19. **Tuomi T., Johnsson T., Reijula K.:** Analysis of nicotine, trans-3'-hydroxycotinine, cotinine, and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 1999, 45, 2164.
20. **Tyrpień K., Wielkoszyński T., Kowalska M. et al.:** Ocena częstości występowania kotyniny i trans-3'-hydroksykotyniny w wybranych próbkach płynów ustrojowych. *Przegl. Lek.* 2006, 63, 897.
21. **Wiergowski M., Nowak-Banasik L., Morkowska A. et al.:** Problematyka oznaczania nikotyny i kotyniny w ludzkim materiale biologicznym w aspekcie badań toksykologicznych. *Przegl. Lek.* 2006, 63, 892.
22. **Xu X., Iba M.M., Weisel C.P.:** Simultaneous and sensitive measurement of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2004, 50, 2323.
23. **Ziegler U.E., Kauczok J., Dietz U.A. et al.:** Clinical correlation between the consumption of nicotine and cotinine concentrations in urine and serum by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Pharmacology* 2004, 72, 254.