Oznaczanie nikotyny i jej metabolitów - kotyniny i trans-3’-hydroksykotyniny w osoczu osób palących techniką HPLC-DAD.

Magdalena Pizoń[1], Jolanta Flieger[1], Wojciech Flieger[2,3]

[1]Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin
[2] Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin
[3]Szkoła Doktorska, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 7, 20-093 Lublin

Wprowadzenie

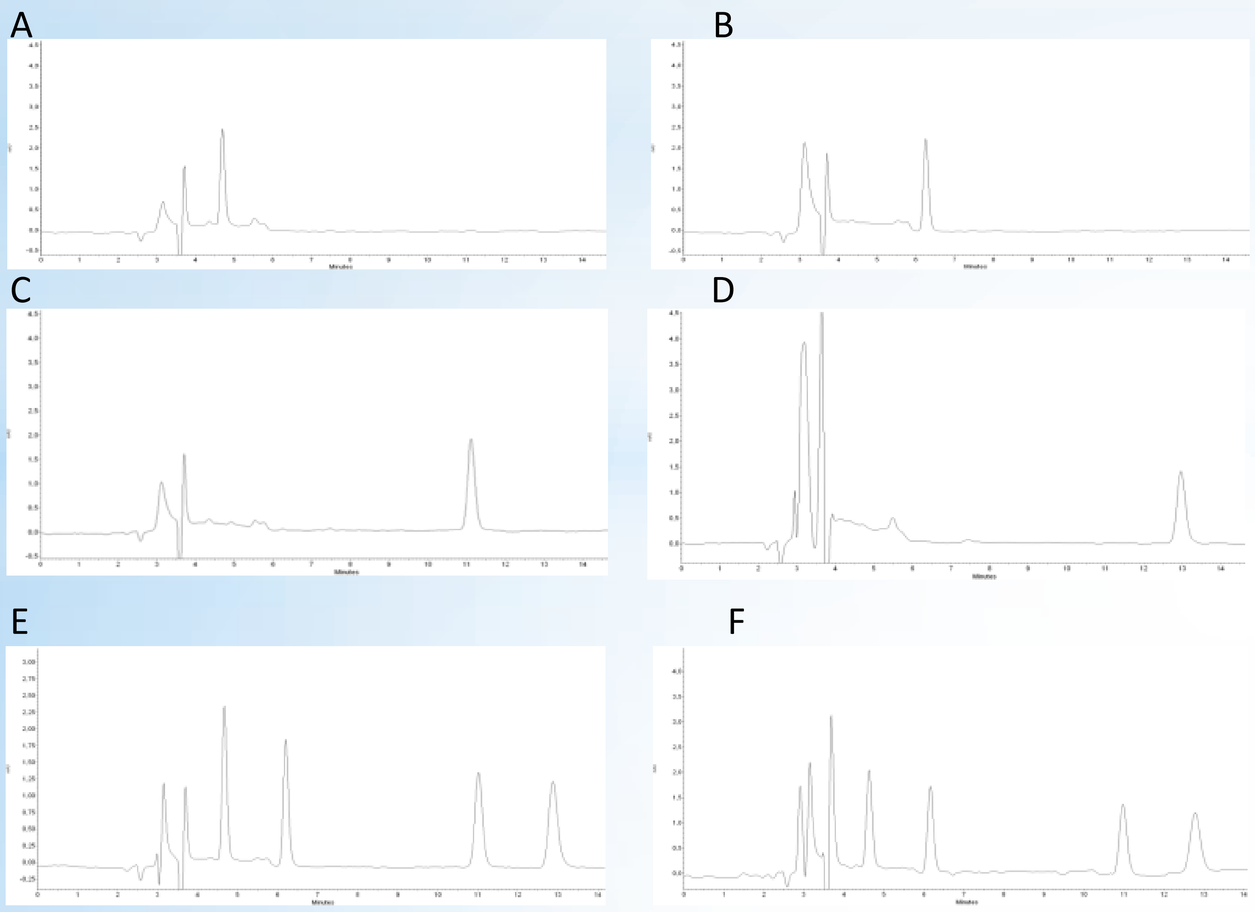
Na całym świecie choroby związane z paleniem tytoniu powodują około 5 milionów przedwczesnych zgonów rocznie [1]. Większość z tych zgonów występuje u palaczy. Istotne zagrożenie dla zdrowia stanowi również narażenie na bierne palenie u osób niepalących .

Szeroko stosowanym podejściem do pomiaru narażenia na nikotynę jest oznaczanie biomarkerów tytoniowych w płynach biologicznych, najczęściej kotyniny (metabolit nikotyny) a także trans-3’-hydroksykotynina (3HC).

W przedstawionej pracy zaproponowano nową, szybką metodę równoczesnego oznaczania nikotyny i jej metabolitów -kotyniny i trans-3’-hydroksykotyniny w osoczu osób palących, technika HPLC-DAD w warunkach elucji izokratycznej.

Analiza HPLC

Analizę HPLC przeprowadzono na aparacie Elite LaChrom HPLC Merck-Hitachi, wyposażonym w detektor DAD, termostat kolumnowy Jetstream 2 Plus. Rozdział prowadzono w temperaturze 30°C na kolumnie Agilent 5 HC-C18(2) (250 x 4,6 mm ID, 5um, 180 A, Agilent Technologies). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu (10%, v/v) z buforem fosforanowy pH = 2,7 (stężenie 10 mM/l w całej fazie ruchomej) i z heksafluorofoforanem sodu (stężenie 30 mM/l). Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml min^{-1}. Detekcję DAD przeprowadzono przy 260 nm. Objętość nastrzyku wynosiła 20 µl. Do analizy ilościowej zastosowano metodę wzorca wewnętrznego (IS kofeina). Wyniki analizay chromatograficznej przedstawiono na rysunkach poniżej :



Rys.1. Chromatogramy HPLC chromatograms otrzymane dla roztworów wzorcowych of trans-3’-hydroksykotyniny (A tr=4.63), kotyniny (B tr=6.16), nikotyny (C tr = 11.01) i kofeiny(D tr = 13.28) o stężeniu 500 ng L^{-1}, dla ich mieszaniny(E) i dla próbki osocza palacza wzbogaconej wzorcem wewnętrznym o stężeniu 100 ng/ml. (F). Analiza była prowadzona w opisanych warunkach chromatograficznych.

Przygotowanie próbek

W badaniu odzysku analitów z matrycy, blanki osocza o objętości 0,01 mL wzbogacano dodając 0,05 mL odpowiedniego roztworu wzorcowego, zapewniając zakres kalibracji od 10- 1000 ng/ml (10, 100, 300, 500, 700 i 1000 ng/ml) oraz poziomy QC 100, 500 i 1000 ng/ml. Badane próbki osocza od palaczy były wzbogacane roztworem wzorcowym kofeiny (jako standard wewnętrzny) w ilosci zapewniającej stężenie 100 ng/ml.

Ekstrakcja próbek

Do otrzymanej mieszaniny blanku osocza i roztworów wzorcowych analitów dodawano 140 µl acetonitrylu, mieszano 30s i wirowano przy 9000 x g przez 30 min. Supernatant z każdej porcji osocza rozcieńczono do 1 ml fazą ruchomą. 20 µl ekstraktu dozowano bezpośrednio na kolumnę HPLC.

Do 400 µl osocza od palacza dodawano roztwór wzorcowy kofeiny (jako wzorzec wewnętrzny) na poziomie 100 ng/ml, następnie dodano acetonitryl w ilości 1.2 ml, mieszano 10 min i wirowano przy 9000 x g przez 30 min. Otrzymany supernatant liofilizowano w liofilizatorze Christ ALPHA 2-4 LD plus, a suchą pozostałość rozpuszczono w 100 µl fazy ruchomej. 20 µl ekstraktu dozowano bezpośrednio na kolumnę HPLC.

Wyniki i dyskusja

Zastosowany system zapewnił wystarczającą sprawność wyrażoną w liczbie półek teoretycznych (USP) i symetrii pików. Dane chromatograficzne potwierdzające dobrą separację analitów przedstawiono w Tabeli 1 . Granice detekcji przy detekcji DAD z uwzględnieniem stosunku sygnału do szumu 3:1 przedstawiono w tabeli 2. LOQ wyrażono jako 3xLOD.

Tab.1. Parametry chromatograficzne

Związek	N/m	As	Rs	α
Trans-3'-hydroksykotynina	27960	1.22	2.34	1.65
Kotynina	39452	1.26	6.05	2.24
Nikotyna	62440	1.25	2.92	1.26
Kofeina	59376	1.29		

Średnie wartości odzysku wyznaczone dla próbek QC metodą SPE-HPLC-DAD mieściły się w zakresie od 96.66% do 99.39%, na trzech poziomach stężeń. Współczynniki zmienności (CV) wynosiły < 5% dla precyzji i < 5% dla precyzji pośredniej. Otrzymane wyniki przedstawia tabela 2.

Tab. 2. Odzyski trans-3’-hydroksykotyniny , kotyniny , nikotyny i kofeiny ze ślepych próbek osocza z wartościami CV precyzji i precyzji pośredniej

Związek	Stężenie analitu w dozowanej próbce [ng/ml]	Precyzja		Precyzja pośrednia		LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]
		Odzysk analitu z matrycy [%±SD]	Współczynnik zmienności [CV]	Odzysk analitu z matrycy [%±SD]	Współczynnik zmienności [CV]		
Trans-3'-hydroksykotynina	100	96.02 ± 2.57	2.67	87.96 ± 3.06	3.47	1.47	4.42
	500	102.22 ± 0.53	0.52	104.61 ± 2.14	2.04		
	1000	100.04 ± 2.35	2.35	101.02 ± 1.98	1.98		
Kotynina	100	93.49 ± 0.32	0.34	97.40 ± 1.63	1.67	1.59	4.78
	500	100.03 ± 1.60	1.59	102.93 ± 2.00	1.95		
	1000	98.02 ± 2.71	2.76	100.37 ± 2.03	2.02		
Nikotyna	100	100.27 ± 3.88	3.87	112.35 ± 6.31	5.61	1.50	4.51
	500	100.68 ± 2.34	2.32	100.60 ± 0.85	0.85		
	1000	97.94 ± 2.71	2.77	94.66 ± 3.10	3.28		
Kofeina	100	110.46 ± 0.54	0.49	109.52 ± 4.80	4.38	1.37	4.10
	500	101.30 ± 0.44	0.44	100.20 ± 3.62	3.61		
	1000	100.00 ± 2.80	2.80	103.85 ± 4.46	4.30		

W osoczu krwi palacza oznaczono kotyninę na poziomie stężenia 5.02 ng/ml i trans-3’-hydroksykotynine w ilości 203.30 ng/ml.

Tab. 3. Poziomy trans-3’-hydroksykotyniny i kotyniny w osoczu palacza.

Zidentyfikowany związek	Oznaczone stężenie[ng/ml] analitów w osoczu osoby palącej, n=3	SD
Trans-3'-hydroksykotynina	203.30	5.94
Kotynina	5.02	1.35