

CHROMBIO. 2690

Note**Méthode rapide de mesure de la nicotine et de la cotinine dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse**

J. GODIN*, F. GIRARD et G. HELLIER

INSERM, Laboratoire de Toxicologie, U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, rue J.B. Clément, 92290 Chatenay-Malabry (France)

(Reçu le 27 février 1985; manuscrit modifié reçu le 19 avril 1985)

La nécessité de tenir compte, lors de la réalisation d'enquêtes épidémiologiques sur les effets du tabac, d'indicateurs spécifiques de l'imprégnation des populations étudiées, rend indispensable la mise au point de techniques analytiques suffisamment simples et fiables pour pouvoir être appliquées à un grand nombre de cas.

Quelques méthodes de dosage de la nicotine et de la cotinine dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse ont été mises au point [1–4]. Certaines nécessitent une extraction distincte de la nicotine et de la cotinine [1, 3] et toutes se terminent par une concentration du solvant utilisé, manipulation délicate qui demande pour donner satisfaction l'utilisation d'un étalon interne dont les propriétés physiques et chimiques sont très voisines de celles de la nicotine et de la cotinine.

Dans ce travail, nous décrivons une technique de dosage de la nicotine et de la cotinine dans l'urine qui ne nécessite pour sa réalisation qu'une seule extraction sans concentration ultérieure du solvant utilisé. Quelques méthodes de mesure de la nicotine et/ou de la cotinine dans le plasma basées sur la même méthodologie ont été signalées [5, 6] mais leur application sans modification à la détermination de ces mêmes composés dans l'urine n'est pas satisfaisante.

MATÉRIELS ET MÉTHODES*Réactifs*

Nicotine Merck-Schuchardt (R.F.A.); cotinine Sarsyntex (U.S.A.); chloroforme Prolabo pour analyses (stabilisé avec 0.6% d'éthanol) (France);

hydroxyde de sodium Prolabo pour analyses; chlorure de sodium Prolabo pour analyses.

Matériels

Chromatographe Intersmat IGC 12 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (France) et d'une colonne de verre de 2 m remplie de SP 2250 DB déposé sur Supelcoport 100—120 mesh (Supelco, U.S.A.). Intégrateur Spectra-Physics 4270 (U.S.A.). Agitateur Vortex-Genie K 550 GE (U.S.A.). Centrifugeuse Jouan K 63 F (France). Tubes à centrifuger Inter Mes Nunc de 50 ml en polypropylène (bouchons polyéthylène), à usage unique.

Technique

Extraction de la nicotine et de la cotinine. 25 ml d'urine sont introduits dans un tube à centrifuger auxquels on ajoute 1 (ou 0,5) ml de chloroforme, 1 ml de soude 5 M et 8,5 g de chlorure de sodium. Les tubes sont agités énergiquement à l'aide d'un agitateur Vortex (graduation 4) pendant 5 min puis soumis à centrifugation à 1000 g pendant 10 min.

Analyse chromatographique. Les analyses de la nicotine sont réalisées par séries, à deux températures de four différentes: 115°C pour la nicotine et 190°C pour la cotinine. Les températures de l'injecteur et du détecteur ne sont pas modifiées lorsque l'on passe d'une détermination à l'autre (240°C). 1 μ l de la solution chloroformique est introduit dans l'injecteur du chromatographe. Chaque jour, une gamme étalon est réalisée dans les mêmes conditions que les dosages avec une urine de non fumeur surchargée avec 0,2, 0,5, 1 et 2 μ g/ml nicotine et cotinine.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Des essais réalisés lors de travaux précédents [2, 3] ont montré que le chloroforme est probablement le meilleur solvant permettant d'extraire simultanément la nicotine et la cotinine; cette étude confirme cette observation.

Toutefois, lors de nos essais, contrairement aux travaux publiés antérieurement, nous avons cherché à n'effectuer qu'une seule extraction de la nicotine et de la cotinine et à ne pas concentrer la phase chloroformique afin d'opérer rapidement, d'éviter les pertes de solvant, de nicotine et de cotinine, et de ne pas utiliser d'étalons internes. Dans ce but, nous avons tout d'abord utilisé un rapport chloroforme—urine suffisamment petit (1:25) pour obtenir une précision analytique satisfaisante. Puis, nous avons recherché les conditions qui permettent d'extraire la nicotine et la cotinine contenues dans l'urine avec des rendements élevés. Ainsi, en présence de soude, plus de 95% de la nicotine sont récupérés dans le chloroforme. Par contre, en utilisant les mêmes conditions opératoires, seulement 39% de cotinine sont extraits de solutions aqueuses et 24% de l'urine, mais en saturant avec du chlorure de sodium, avec les mêmes milieux, les rendements passent à 92% et 88% respectivement. L'addition de chlorure de sodium a peu d'influence sur les quantités de nicotine extraites.

Néanmoins, pour atteindre ces rendements d'extraction, une agitation efficace est indispensable. Parmi les moyens utilisés, seul le système Vortex

nous a permis d'obtenir de bons résultats dans un temps suffisamment court.

En appliquant cette technique, il est possible de mesurer 50 ng/ml nicotine et cotinine dans l'urine; sensibilité suffisante pour la réalisation de nos travaux puisqu'un fumeur (20 cigarettes/jour) élimine dans l'urine des quantités de nicotine et de cotinine supérieures à 1 µg/ml.

Les coefficients de variation calculés à partir de dix résultats de mesures réalisées sur un même échantillon d'urine de fumeur contenant respectivement 300 ng/ml nicotine et 360 ng/ml cotinine sont de 3,80% et 2,73%.

CONCLUSIONS

Ce travail nous a permis de mettre au point une technique de mesure de la nicotine et de la cotinine dans l'urine plus simple et plus rapide que les techniques actuellement connues.

Cette méthode présente également l'avantage, en ne comportant pas dans son application de phase d'évaporation de solvant, d'éviter d'avoir recours aux étalons internes commercialement disponibles, notamment à la quinoléine, dont l'utilisation conduit à une grande variabilité dans les résultats de mesure [3]. D'autres composés utilisés plus récemment comme étalons internes de structures plus proches de la nicotine et de la cotinine, semblent néanmoins donner de bien meilleurs résultats mais doivent préalablement être synthétisés [3, 7].

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A.H. Beckett et E.J. Triggs, *Nature* (London), 211 (1966) 1415-1417.
- 2 C. Dumas, A. Durand, R. Badré, J.-P. Cano, A. Viala et R. Guillermin, *Eur. J. Toxicol.*, 8 (1975) 142-151.
- 3 P. Jacob, III, M. Wilson et N.L. Benowitz, *J. Chromatogr.*, 222 (1981) 61-70.
- 4 G. Stehlik, J. Kainzbauer, H. Tausch et O. Richter, *J. Chromatogr.*, 232 (1982) 295-303.
- 5 M. Curvall, E. Kazemi-Vala et C.R. Enzell, *J. Chromatogr.*, 232 (1982) 283-293.
- 6 D. Hill, W. Brande, D. Philipps et O. Pomerleau, *Anal. Lett.*, 16 (1983) 355-365.
- 7 J.-P. Thenot et A. Hung, *Trace Organic Analysis: A New Frontier in Analytical Chemistry*, National Bureau of Standards, Special Publication No. 519, 1979, pp. 419-427.