

CHROMBIO. 4571

**Note****Méthode de dosage de la nicotine et de la cotinine dans l'urine par chromatographie liquide à haute performance**

JEAN GODIN\* et GEORGETTE HELLIER

*I.N.S.E.R.M. Unité 169, 16 Avenue Paul-Vaillant Couturier, 94 807 Villejuif Cédex (France)*

(Reçu le 25 août 1988; manuscrit modifié reçu le 26 octobre 1988)

La nicotine et son métabolite, la cotinine, sont des indicateurs spécifiques de l'exposition à la fumée de tabac. Pour cette raison, la mesure de ces composés dans certains compartiments biologiques a été largement utilisée en tant qu'indicateur d'exposition au tabac pour la réalisation de nombreuses enquêtes épidémiologiques.

Parmi les fluides biologiques humains qui peuvent être aisément prélevés sans causer de préjudice au donneur, l'urine présente l'avantage de pouvoir être obtenue en quantité importante; condition nécessaire pour la mise au point de la méthode décrite.

Les techniques de mesure de la nicotine et de la cotinine les plus couramment utilisées font appel à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) [1-3] ou à des techniques de dosages radioimmunologiques (DRI) [4,5]. Ces deux méthodes de dosage ont fait l'objet d'importants travaux d'intercomparaison par plusieurs laboratoires [6] alors qu'aucune méthode de chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ne semble encore être utilisée pour des travaux de routine. Toutefois, quelques techniques mettant en oeuvre la CLHP ont été expérimentées [7-12] mais leurs performances ne semblent pas encore suffisantes pour concurrencer la CPG et les DRI. Aussi, les travaux réalisés dans le cadre de cette étude ont eu pour objectif d'abaisser les limites de détection de la nicotine et de la cotinine, d'effectuer, avant l'analyse chromatographique, une bonne séparation de ces composés des autres constituants de l'urine, d'éviter d'utiliser des techniques de purification préalables complexes ou délicates à mettre en oeuvre. De plus, le recours à l'emploi de colonnes chromatographiques à polarité de phase inversée pour la séparation chromatographique a paru souhaitable pour traiter un grand nombre d'échantillons. Aucune des techniques actuellement connues

ne répondent à tous ces critères. Certaines utilisent des méthodes de séparation longues et difficiles (colonnes de préconcentration, évaporation de solvants...) [8,9]. Dans certains cas, les quantités de nicotine et de cotinine introduites après traitement de l'urine, dans la colonne chromatographique sont faibles [7,9,11]. Enfin, l'analyse est parfois effectuée à l'aide de colonne de silice [8,11].

Notons enfin que la nicotine et la cotinine ont été séparées de l'urine en utilisant une technique qui avait été mise au point pour la mesure de ces composés par CPG et publiée antérieurement [13].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Réactifs*

Nicotine: Merck-Schuchardt (Darmstadt, R.F.A.); cotinine: Sarsyntex (Genay, France). Les solvants et autres produits utilisés sont de qualité pour analyses ou pour CLHP et sont fournis par Probabo (Paris, France) ou Merck (Darmstadt, R.F.A.).

### *Préparation des solutions étalon et de la phase mobile*

Des solutions concentrées de nicotine, cotinine et pyridine sont préparées en dissolvant 50 mg environ de chaque composé dans 10 ml de méthanol. Une solution diluée est ensuite obtenue en ajoutant 80  $\mu$ l des solutions concentrées de nicotine et de cotinine à 840  $\mu$ l d'eau distillée. Cette solution est utilisée pour réaliser les surcharges de l'urine nécessaires pour la confection de la courbe d'étalonnage. Une solution diluée de pyridine est préparée en ajoutant 80  $\mu$ l de la solution concentrée de pyridine à 920  $\mu$ l d'eau distillée. La phase mobile est obtenue en mélangeant 650 ml d'eau distillée, 290 ml de méthanol, 40 ml de tampon acétate de sodium 1 M, pH 4,6 et 20 ml d'acétonitrile. Le pH de la solution est fixé à 6,40 par addition de triéthylamine.

### *Matériel*

CLHP: pompe Spectra Physics SP 8770 (U.S.A.) (débit: 1,3 ml/min); détecteur UV 254 nm Spectra-Physics SP 8300; passeur automatique d'échantillons Kontron MSI T660 (Suisse); enregistreur Sefram (France); colonne (22 cm) RP-18 Spheri 5 Brownlee Labs. (U.S.A.); colonne de garde (3 cm) contenant la même phase stationnaire. Agitateur Heidolph Top-Mix 94 323 (R.F.A.). Centrifugeuse Sorvall SS1 (U.S.A.). Tubes à centrifuger de 50 ml en polypropylène Inter Med Nunc (U.S.A.). Tubes en Pyrex: 16×100 mm Corning (Angleterre). Colonne de filtration Baker-10 SPE<sup>TM</sup> (U.S.A.) 6 ml, disque fritté 20  $\mu$ m.

### *Extraction*

Vingt cinq millilitres d'urine sont introduits dans un tube à centrifuger auxquels on ajoute 100  $\mu$ l de la solution diluée de pyridine (étalon interne), 1 ml d'hydroxyde de sodium 5 M, 8,5 g de chlorure de sodium et 5 ml de chloroforme. Les tubes sont ensuite agités énergiquement à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 5 min puis centrifugés à 1000 g. Pour certaines urines, les quantités de phase chloroformique recueillies après agitation et centrifugation sont trop peu importantes. Dans ce cas, une nouvelle extraction avec 5 ml de chloroforme est effectuée.

La phase chloroformique est séparée puis filtrée sur colonne Baker dans des tubes en verre. La nicotine et la cotinine sont de nouveau extraites avec 1 ml d'acide phosphorique 0,05 M en agitant les tubes pendant 5 min à l'aide d'un agitateur rotatif. Après 10 min de repos, la phase acide est recueillie et introduite, avec 25  $\mu$ l d'une solution de phosphate tripotassique 0,5 M, dans l'un des tubes du passeur automatique d'échantillons.

### *Etalonnage*

La courbe d'étalonnage est établie à partir des hauteurs de pic mesurées après surcharge de l'urine d'un non fumeur ne contenant pas de quantités détectables de nicotine et de cotinine, avec des solutions diluées de nicotine, de cotinine et de pyridine traitée dans les mêmes conditions que les échantillons d'urine à analyser.

### RÉSULTATS

La Fig. 1 reproduit deux chromatogrammes, l'un de fumeur (A), l'autre de non fumeur (B). Les temps de rétention de la nicotine, de la cotinine, de la caféine et de la pyridine sont respectivement de 4, 4,5, 5 et 6,6 min (la caféine est presque totalement éliminée lors des extractions effectuées avant l'analyse chromatographique).

La linéarité de la courbe d'étalonnage a été vérifiée pour des concentrations de 10–4.000 ng de nicotine ou de cotinine par ml d'urine. Le seuil de détection (5 fois le bruit de fond) est inférieur à 10 ng/ml d'urine pour les deux composés.

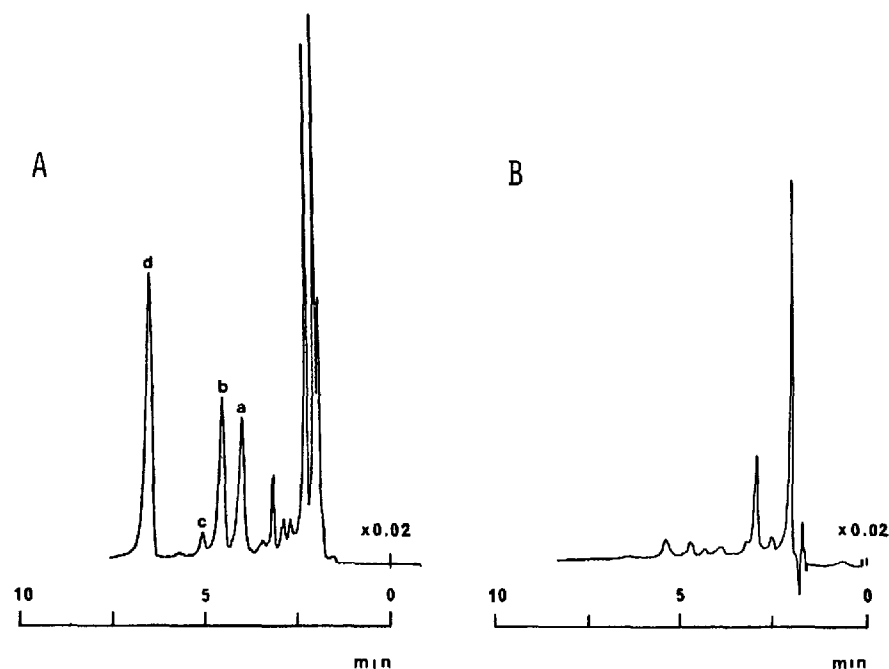


Fig. 1. (A) Chromatogramme d'urine de fumeur; pics: a = nicotine (1250 ng/ml); b = cotinine (1200 ng/ml); c = caféine; d = pyridine (étalon interne). (B) Chromatogramme d'urine de non fumeur.

Les coefficients de variation calculés à partir des résultats de mesure de la nicotine et de la cotinine dans dix échantillons de la même urine sont respectivement de 1,65 et 1,71% (les concentrations de nicotine et de cotinine dans l'urine étant de 1250 et 1200 ng/ml, respectivement; exemple, Fig. 1).

## DISCUSSION

La mise en oeuvre de la technique décrite fait appel à un appareillage CLHP courant. Cette technique présente également l'avantage de permettre une mesure simultanée de la nicotine et de la cotinine.

Les différentes phases de l'extraction de la nicotine et de la cotinine ne présentent pas de difficultés techniques: aucune concentration par évaporation est notamment nécessaire. Les rendements d'extraction sont élevés. Ceux de la cotinine et de la pyridine sont très sensiblement augmentés par addition de chlorure de sodium (de l'ordre de 43 et 34%, respectivement) alors que la présence de chlorure de sodium n'a pas d'influence sur la quantité de nicotine extraite. En opérant une double extraction, alcaline puis acide, la pureté de l'échantillon est suffisante pour éviter une détérioration rapide de la colonne, éliminer de nombreux composés principalement ceux dont les temps de rétention sont élevés, et éviter les interférences. L'étalon interne utilisé est très courant dans les laboratoires et facilement extractible en milieu acide.

La séparation par CLHP est rapide (moins de 10 min) et les composés sont nettement différenciés. L'utilisation pour la préparation de la phase mobile, d'un tampon dix fois plus concentré que celui préconisé par Kyerematen améliore la résolution des pics. En employant une phase mobile dont le pH a été fixé à 6,40 au lieu de 6,26, le temps de rétention de la nicotine est plus élevé, permettant ainsi d'isoler le pic de la nicotine dans une zone du chromatogramme non encombrée par les constituants de l'urine les plus rapidement élués.

En opérant deux extractions successives, les composés à doser se trouvent fortement concentrés (25 fois), abaissant ainsi les seuils de détection de la nicotine et de la cotinine à de faibles valeurs (moins de 10 ng/ml d'urine). Bien qu'encore plus élevés que ceux obtenus par CPG (1-5 ng/ml d'urine) et par DRI (0.5 ng/ml d'urine), ils permettent néanmoins de différencier aisément les fumeurs des non fumeurs.

Les volumes d'urine nécessaires pour réaliser ce dosage étant relativement élevés (25 ml), il ne semble pas possible d'envisager une utilisation de cette technique pour la mesure de la nicotine et de la cotinine dans d'autres fluides biologiques humains.

Le nombre d'échantillons d'urine qu'il est possible d'analyser journalièrement par cette méthode CLHP et par CPG est comparable (25-30). En revanche, dans le même temps, un nombre nettement plus important de DRI peuvent être réalisés (80 par jour).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. Jacob, III, M. Wilson et N.L. Benowitz J. Chromatogr., 222 (1981) 61.

- 2 N. Hengen et M. Hengen, *Clin. Chem.*, 24 (1978) 50.
- 3 C. Feyerabend et M.A.H. Russell, *Analyst*, 105 (1980) 993.
- 4 J.J. Langone, H.B. Gjika et H. Van-Vunakis, *Biochemistry*, 12 (1973) 5025.
- 5 G.J. Knight, P. Wylie, M.S. Holman et J.E. Haddow, *Clin. Chem.*, 31 (1985) 118.
- 6 A. Biber, G. Scherer, I. Hoepfner, F. Adlkofer, W-D. Heller, J.E. Haddow et G.J. Knight, *Toxicol. Lett.*, 35 (1987) 45.
- 7 I.D. Watson, *J. Chromatogr.*, 143 (1977) 203.
- 8 M.P. Maskarinec, R.W. Harvey et J.E. Caton, *J. Anal. Toxicol.*, 2 (1978) 124.
- 9 G.A. Kyerematen, M.D. Damiano, B.H. Dvorchik et E.S. Vesell, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32 (1982) 769.
- 10 K.C. Cundy et P.A. Crooks, *J. Chromatogr.*, 281 (1983) 17.
- 11 M. Horstmann, *J. Chromatogr.*, 344 (1985) 391.
- 12 R.D. Barlow, P.A. Thompson et R.B. Stone, *J. Chromatogr.*, 419 (1987) 375.
- 13 J. Godin, F. Girard et G. Hellier, *J. Chromatogr.*, 343 (1985) 424.