

Bestämning av kotinin/nikotin i biologiska prover (urin och serum/plasma) med HILIC-MS/MS



LUNDS
UNIVERSITET

Lunds Tekniska Högskola

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg

Examensarbete:
See Mei Ngo

© Copyright See Mei Ngo

LTH Ingenjörshögskolan vid Campus Helsingborg
Lunds Universitet
Box 882
251 08 Helsingborg

LTH School of Engineering
Lund University
Box 882
SE-251 08 Helsingborg
Sweden

Tryckt i Sverige
Media-Tryck
Biblioteksdirektionen
Lunds Universitet
Lund 2006

Sammanfattning

Nikotin är den principiella alkaloiden i tobak och är ämnet som framkallar ett beroende hos människan. Ämnena i tobak ger upphov till sjukdomar såsom lungcancer, astma, allergi och hjärt- och kärlsjukdomar.

I kroppen sker en omvandling av nikotin till dess huvudmetabolit kotinin. Mängden kotinin är ett användbart biologiskt mått på hur mycket nikotin man exponerats för. Vid nedbrytningen av nikotin bildas förutom kotinin även kotininkonjugat. Endast en liten del av den totala mängden kotinin finns fritt. Vid hydrolys av ett biologiskt prov frigörs kotinin från konjugatet och den bundna mängden kan sålunda bestämmas. I detta exjobb studerades därför hydrolys av prover för att kunna göra en kvantifiering av totala mängden kotinin.

Genomförda försök visar att den bundna kotininen ökar ju längre tiden mellan exponering och provtagning är. Men till slut blir mängden konstant. Den fria kotininen är däremot aldrig konstant och varierar i förhållande till exponeringstillfället. Hydrolyserar man inte sina prover, så att mätningen endast avser fri kotinin, kan man få ett missvisande resultat som beror på tiden mellan exponering och provtagning. Bunden kotinin som biomarkör skulle kunna ge en stabilare bild av nikotinexponering.

I detta arbete presenteras en metod för bestämning av fri kotinin och totala mängden kotinin i urin och serum. Metoden bygger på hydrolys av prov (för total bestämning av kotinin) och extraktion i metylenklorid. Bestämning av kotinin har gjorts med HILIC-MS/MS.

En förenklad upparbetningsmetod, filtrering av urin, för fri kotinin har även studerats.

HILIC-MS/MS som analysteknik möjliggjorde selektiva bestämningar av kotinin i låga halter. För prover upparbetade med extraktion i metylenklorid var den instrumentella detektionsgränsen $9,2 \cdot 10^{-2}$ pg. Filtrerade urinprover hade en något högre detektionsgräns p g a en stökigare matris och sämre kromatografi.

Vid hydrolys av prover från nikotinexponerade personer med olika hydrolysbetingelser, visade sig basisk hydrolys (12 M NaOH, 30 min, 70 °C) vara mest effektiv.

Nyckelord: kotinin, nikotin, total kotinin, HILIC-MS/MS, urin, filtrering

Abstract

Nicotine is the primary alkaloid in tobacco and it is the major cause for the addiction to tobacco. The chemical substances in tobacco cause diseases such as lung cancer, asthma, allergies and cardiovascular diseases.

Cotinine is the major metabolite from nicotine and is a well used biomarker for determination of exposure to nicotine. Besides cotinine, conjugates to cotinine are major metabolites from nicotine. The free cotinine is only a small amount of the total cotinine. For the total determination of cotinine in biological samples the cotinine must be released from the conjugates. The breakage of the bond between cotinine and conjugate can be done with hydrolysis of a biological sample and the bonded cotinine can then be determined. Hydrolysis of samples has therefore been studied in this thesis.

Performed tests show that the bonded cotinine increases as longer the time goes between exposure and sampling, but remains constant after a while. The amount of free cotinine is on the other hand never constant and varies with time of exposure. If the samples don't get hydrolyzed the results we get are therefore misleading, which depends on the time between exposure and sampling. A more stable biomarker of nicotine exposure would therefore be bonded cotinine.

In this work a method for determination of free cotinine and total cotinine in urine and serum has been presented. The method is based on hydrolysis of biological samples (for total determination of cotinine) and extraction in methylene chloride. Determination of cotinine has been done with HILIC-MS/MS.

A simplified work up procedure, filtration of urine, for determination of free cotinine has also been studied.

HILIC-MS/MS as an analysis technique made it possible for selective determination of cotinine in low concentration. Samples that are worked up by extraction in methylene chloride had an instrumental detection limit of $9,2 \cdot 10^{-2}$ pg. Urine samples that are filtrated had a higher detection limit because of the filtrate containing interfering substances and poorer chromatography.

Samples from persons, who had been exposed to nicotine, were hydrolysed in different hydrolysis environments. Experiments showed that alkalized hydrolysis (12 M NaOH, 30 min, 70 °C) was most effective.

Keywords: cotinine, nicotine, total cotinine, HILIC-MS/MS, urine, filtration

Förord

Detta examensarbete är utfört på institutionen för Analytisk Kemi, avdelningen för Arbetsmiljökemi, Stockholms universitet, Häsleholm.

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Daniel Karlsson som med sitt obegränsade tålamod hjälpte mig mycket med detta arbete. Utan hans hjälp hade detta examensarbete inte kunnat utföras. Vill även tacka min examinator Margaretha Sandahl för all hjälp hon givit mig samt alla på institutionen som ställt upp med det praktiska. Sist men inte minst vill jag tacka familj och vänner för deras stöd.

Innehållsförteckning

1 Inledning	1
1.1 Nikotin	1
1.1.1 Metabolismen.....	1
1.2 Exponering	3
1.2.1 Tobaksrök.....	3
1.2.2 Livsmedel.....	4
1.3 Hälsoeffekter	4
1.4 Metoder för att mäta nikotinexponering	4
1.4.1 Biomarkörer	5
1.5 Biologiska matriser	5
1.5.1 Blod, serum och plasma.....	5
1.5.2 Saliv	6
1.5.3 Urin	6
1.5.4 Övrigt	6
1.6 Analytiska tekniker	6
1.6.1 Vätskekromatografi.....	7
1.6.1.1 HILIC.....	7
1.6.2 Masspektrometri	8
1.6.2.1 Elektrospray	9
1.6.2.2 Kvadrupol	10
2 Målsättning	12
3 Material och metoder	13
3.1 LC-MS/MS	13
3.2 Övrigt	13
3.3 Standardlösning	13
3.4 Förvaring	14
3.5 Upparbetning	14
3.5.1 Extraktion med metylenklorid	14
3.5.2 Filtrering.....	16
3.6 Hydrolys	17
3.7 Förhållandet mellan bunden och fri kotinin	17
4 Resultat och diskussion	19
4.1 Kromatografi	19
4.2 Masspektrometri	21
4.3 Upparbetning	21
4.3.1 Extraktion.....	21
4.3.2 Filtrering.....	22
4.4 Hydrolys	22
4.5 Kvantifiering	24
4.5.1 Kvantifiering	24

4.5.2 Repeterbarhet.....	24
4.5.3 LOD.....	25
4.6 Förhållandet mellan bunden och fri kotinin.....	25
5 Slutsatser	28
6 Referenser	29
Appendix 1	32
Appendix 2	33

1 Inledning

Tobak utvinns ur torra blad från växten *Nicotiana tabacum* och består av det beroendeframkallande ämnet nikotin [1, 2, 3, 4]. Tobak används främst för tobaksrökning och är den största handelsvaran i världen. Den industriella produktionen av cigaretter och cigarrer började runt 1880 i Amerika och runt 1900 i Sverige [4, 5].

1.1 Nikotin

Nikotin utgör 2-8 % av bladens torrsvikt. Rent nikotin är en färglös vätska med en skarp lukt. Vid utsättning för luft och ljus förändras den färglösa eller svagt gula, oljiga vätskan till en brun färg. Det bruna nikotinet är lika giftigt som färglöst nikotin. Nikotin är en svag bas och är lösligt både i vatten och i lipider.

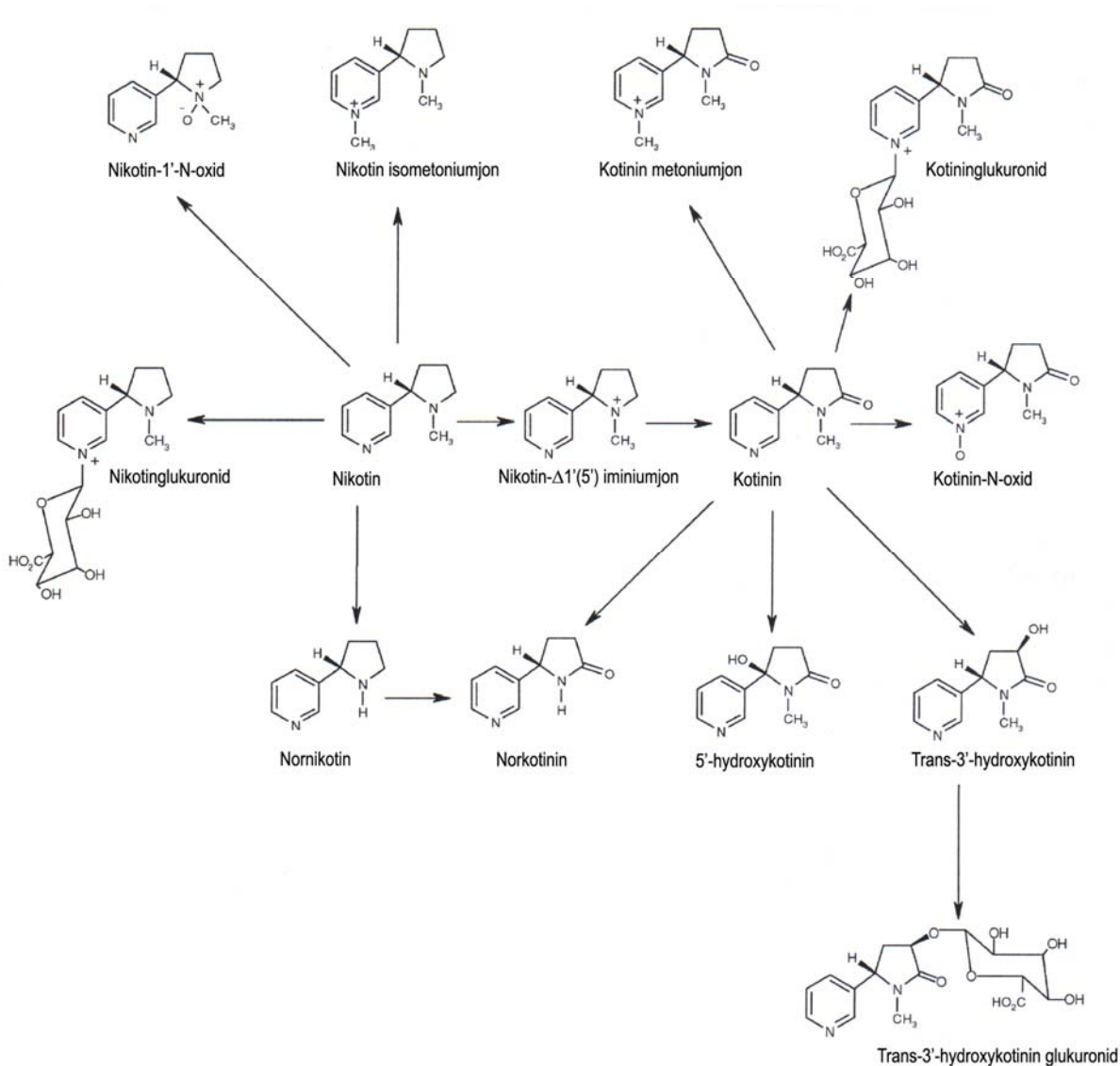
Nikotin är den principiella alkaloiden i *Nicotiana tabacum*. Substansen är både en alkaloid och en tertiär amin och består av både en pyridin- och pyrrolidinring. Många pyridinalkaloider finns i *Nicotiana tabacum*, men nikotin utgör > 90 % av alla alkaloider i växten. Andra dominanta alkaloider i *Nicotiana tabacum* är nornikotin, anatabin och anabasin, vilka tillsammans utgör ≤ 5 % av totala alkaloidinnehållet [5].

1.1.1 Metabolismen

Nikotin i joniserad form penetrerar långsamt genom membraner. I dess icke-joniserade form absorberas nikotin däremot snabbt genom slemhinnans membraner (pK_a – värden runt 3,2 och 7,9). Efter absorption går nikotin in i blodbanan [5].

Huvudmetabolismen av nikotin sker i levern, men också i lungorna och i njurarna. Nikotin metaboliseras av enzymet Cytokrom P-450 till mer än 20 olika derivater [2 - 4, 6] (figur 1). Omkring 65-75 % av nikotinet konverteras till dess huvudmetabolit kotinin via koloxidation [2, 4, 6 - 8]. 4 % oxideras till annat. 9 % utsöndras oförändrat i urinen och resterande 17 % konverteras via andra reaktionsvägar till annat [2]. Studier har visat att ca 80-85 % av nikotinupptaget hamnar i urinen [7].

Kotinin genomgår vidare metabolism via *N*-oxidation och *C*-oxidation. Dessa oxidationer är katalyserade av mikrosomala enzymer för att producera fyra metaboliter; kotinin-*N*-oxid (CNO), 3'-hydroxykotinin (3-OCH), *N*-hydroxymetylnorkotinin (NHMC) och 5'-hydroxykotinin (5-OCH) [5, 9].



Figur 1 - Några av nikotinets metaboliter [1]

Glukuronidkonjugater till nikotin, kotinin och 3'-hydroxykotinin utgör en stor del av nikotinmetaboliterna; nikotinglukuronid utgör 3 % av totala nikotinhalten i kroppen [5], kotininglukuronid 25-30 % [9] och 3'-hydroxykotininglukuronid 23 % [5]. Glukuronsyrakonjugat i nikotinmetabolismen upptäcktes i slutet av 1980-talet.

1.2 Exponering

1.2.1 Tobaksrök

Det finns många former av tobaksbruk (t ex snus, cigaretter, tuggtobak m m) och cigaretter är en vanlig form.

Tusentals ämnen har upptäckts i tobaksrök från t ex cigaretter. Bland dessa ämnen är flera av dem carcinogena [4, 6]. I tobaksrök finns 50 kända mutagener och 11 av dessa är djurcarcinogena.

En del metaller som kommer från jorden, gödsel, pesticider och förorenat regn kan också hittas i tobaksplantan, t ex kadmium (Cd) 1-10 $\mu\text{g/g}$ tobak, bly (Pb) >1-10 $\mu\text{g/g}$ och arsenik (As) 1-10 $\mu\text{g/g}$. Omkring 1-10 % av dessa metaller går till "mainstream smoke" [4].

Man brukar vanligtvis ha tre kategoriseringar på röken som kommer från cigaretter:

- "Mainstream smoke" (MS, huvudrök): röken som rökaren suger i sig
- "Sidestream smoke" (SS, sidorök): det cigaretten avger mellan blossen
- "Environmental tobacco smoke" (ETS): en blandning av sidorök (85 %) och huvudrök (15 %)

Det kemiska innehållet i MS, SS och ETS är kvalitativt detsamma men kvantitativt olikt [5] (figur 2).



Figur 2 - Illustration som beskriver skillnaden mellan MS, SS och ETS

1.2.2 Livsmedel

Nikotin kan också finnas i livsmedel, speciellt från grönsaksfamiljen *Solanaceae* där bl a potatis, tomat och paprika ingår. Nikotinet i livsmedlet kan därför bidra till att öka halten nikotinmetaboliter i kroppen.

Man tror att nikotinet i plantorna fungerar som ett naturligt försvar mot svampar, bakterier, insekter och djur [5].

1.3 Hälsoeffekter

På 1950-talet kunde man utifrån epidemiologiska studier se en ökning av antalet *lungcancerfall* bland rökare. Väl dokumenterat var även effekten av aktiv rökning på *lungornas funktion*. Rökare jämfört med icke-rökare hade också högre halter av IgE (immunoglobulin E) i serum, vilket tydde på en ökad risk för *allergiska besvär*. Undersökningar visade även att tobaksrök förstörde luftvägens epitel och ökade därmed permeabiliteten av partiklarna i röken till luftvägarna. Detta ökade i sin tur allergenernas framkomlighet till immunoreaktiva celler, vilket är en process som startar en induktion till allergi [4]. *Astma, luftrörsinfektioner* och *hjärt- och kärlsjukdomar* är andra symptom som kan uppstå i samband med nikotinexponering [1, 2, 4].

Varje år uppskattas dödssiffran p g a tobaksbruk ligga på 3 miljoner. Passiva rökare påverkas också negativt. Bland icke-rökare dör varje år omkring 3000 av lungcancer [2]. Enligt IARC (International Agency for Research on Cancer) klassas ETS som lungcarcinogent [6].

1.4 Metoder för att mäta nikotinexponering

Det finns olika sätt att mäta nikotinexponering:

- Frågeformulär (inte så pålitliga)
- Biomarkörer (mer pålitliga)
- Mäta nikotinhalt i luft

En idealisk biomarkör är specifik, har enkel provtagning, långsam nedbrytning och har ett linjärt förhållande till exponeringen [4].

Mätning av nikotin/kotinin sker bl a för att [5]

- bevisa att man har exponerats för tobaksrök
- jämföra exponeringsgraden mellan rökare och icke-rökare
- indikera rökare som anger sig vara icke-rökare
- kvantifiera exponeringen hos rökare
- jämföra exponering hos olika rökare
- kvantifiera utsättningen för ETS hos icke-rökare
- undersöka hur nikotinexponering relateras till sjukdomar

1.4.1 Biomarkörer

Kotinin är en vanlig biomarkör för att påvisa närvaro av nikotin [1, 2, 10 - 13]. I och med att kotinin har längre halveringstid (15-20 h) än nikotin (1-2 h) är den en bättre nikotinindikator än själva nikotinet [2, 3, 10]. Metaboliten finns i ca 10 gånger högre koncentration i kroppen än vad nikotin gör [5]. Genom att mäta halten kotinin i biologiska matriser, främst serum, plasma, urin och saliv hos aktiva och passiva rökare, kan man få en uppfattning av hur mycket nikotin man exponerats för [2, 5, 8, 9, 14, 15]. Kotinin uppstår endast från nedbrytningen av nikotin och har därför en 100 % specificitet för exponeringen av tobaksrök [2, 4, 5, 12].

Nikotin kan man också bestämma i prover, men är dock inte en idealisk biomarkör p g a den korta halveringstiden [2 - 4, 12].

1.5 Biologiska matriser

I detta kapitel beskrivs några vanliga biologiska matriser som man mäter nikotin och dess metaboliter i.

1.5.1 Blod, serum och plasma

Analyt(er) separeras från serum eller plasma genom vätske-vätske-extraktion (LLE) av det alkaliserade provet. Blod har ett stort innehåll av proteiner, som lätt binder till sig läkemedel och metaboliter i matrisen och därför måste man avlägsna dem för att inte störa analysen. När man extraherar provet kommer dessutom det organiska lösningsmedlet att denaturera proteinet, vilket leder till en emulsionsbildning. Detta är ett problem, men det kan lösas genom att man tillsätter ett salt för utfällning av proteinet (se upparbetningsavsnittet 3.5.1).

1.5.2 Saliv

I jämförelse med plasma och urin är saliv relativt fri från interfererande substanser. Saliv innehåller mindre protein än serum (<1 %), så avlägsning av protein från saliven är inte nödvändig.

1.5.3 Urin

Jämfört med plasma är urin relativt fri från proteiner och lipider, men innehåller å andra sidan många interfererande substanser. Med tanke på det lilla innehållet av proteiner och lipider kan urin extraheras direkt med ett organiskt lösningsmedel eller i vissa fall analyseras direkt.

Högsta koncentrationen av kotinin finns i urin, medan plasma och saliv har ungefär samma koncentration (vanligtvis med en faktor 5 till 6 lägre) [5].

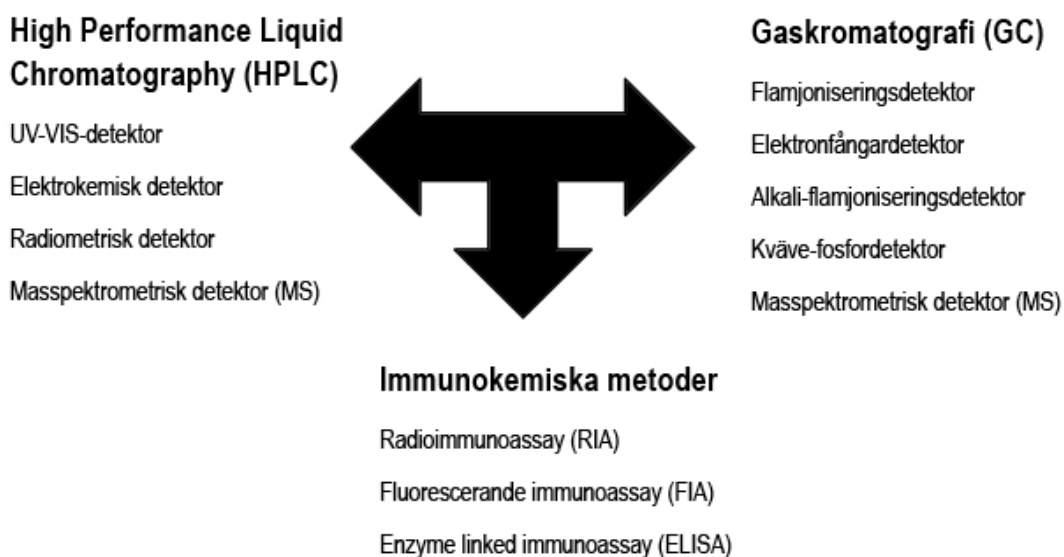
1.5.4 Övrigt

Andra matriser som används vid kvantifiering av kotinin hos aktiva rökare är bl a hår, fostervatten och ryggmärgsvätska. Naglar har också använts vid mätning av nikotinkoncentration [2].

1.6 Analytiska tekniker

Vanliga analytiska tekniker för bestämning av nikotin och dess metaboliter är gaskromatografi (GC), vätskekromatografi (HPLC), ”radioimmunoassay” (RIA), ”enzyme-linked immuno assay” (ELISA) [1, 3, 7, 9, 11, 12] och kolorimetriska tekniker [1, 2] (figur 3). Bland dessa är GC den känsligaste metoden med ett LOD (limit of detection) på ng/l prov [14]. Skillnaden mellan GC och LC är att LC kan analysera svårflyktiga och termolabila ämnen, vilket inte GC kan. Immunoassays-metoder är relativt känsliga men nackdelen är att de har lägre specificitet p g a svårigheten att skilja på vissa aktiva analyter. Fördelen är den mindre provvolym som man behöver till analysen.

En teknik som utvecklats först det senaste årtiondet är LC kopplad till en masspektrometer (LC/MS). Tekniken är snabb, känslig och selektiv när det gäller mätning av nikotin och dess metaboliter.



Figur 3 - Analytiska tekniker för bestämning av nikotin och dess metaboliter i biologiska prov [5]

1.6.1 Vätskekromatografi

Vätskekromatografi är en separationsteknik som bygger på samma princip som extraktion. Skillnaden är att man i LC har en fas som hålls stilla (stationär fas) medan den andra fasen är rörlig (mobilfas). Mobilfasen är antingen en gas eller en vätska som förflyttas genom kolonnen och stationärfasen är en viskös vätska som är kemiskt bunden till partiklar som är packade på insidan av kolonnen [16]. Vanliga LC-detektorer är refractive index-, elektrokemiska-, fluorescerande och UV-VIS-detektorer [17].

De första rapporterna om bestämning av nikotin och dess metaboliter i biologiska vätskor hos rökare med hjälp av HPLC kom på 1970-talet [2].

Kotinin och nikotin är väldigt polära substanser och retarderas väldigt lite på *Reversed Phase* (RPLC). *Normal Phase* (NPLC) separerar feta analyter och är därför inget alternativ. HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) separerar väldigt polära föreningar och klarar därför av föreningar som inte retarderas på RP.

1.6.1.1 HILIC

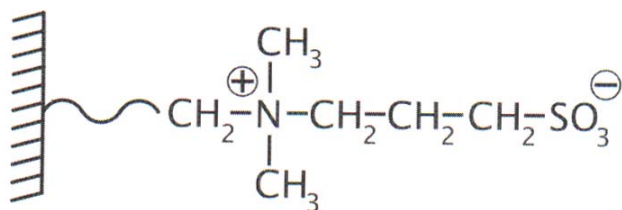
HILIC är en kromatografisk metod för att separera väldigt polära och små föreningar [18, 19]. Ju mer polär molekylen är desto längre är uppehållstiden i kolonnen [16]. Molekyler som har väldigt liten eller ingen retention alls i RPLC upplever istället en stark retention i HILIC. I likhet med NPLC erhåller man i HILIC en elueringsordning som är tvärtemot vad man får i RPLC.

Det vanligaste och populäraste polära, organiska lösningsmedel man har som mobilfas i HILIC är acetonitril. Acetonitril är effektivast och ger därför höga retentionsfaktorer (k). Typiska eluenter i HILIC består av 40-97 % acetonitril i vatten eller i en flyktig buffert.

En gradienteluering i HILIC utförs genom att man ökar polariteten i mobilfasen, d v s minskar på koncentrationen av organiskt lösningsmedel - till skillnad från RPLC som *ökar* den organiska halten istället. Man ska aldrig låta en gradient i HILIC gå från 100 % organiskt till 100 % vatten p g a att den stationära fasen i HILIC inte tolererar stora gradientförändringar.

De flesta HILIC-kolonner har en stationär fas gjord av silika och tål därför inte höga pH. Man bör därför helst ligga inom pH-området 3-8. Det finns även en silikabaserad stationär fas som är kovalent bunden till en permanent zwitterjonisk funktionell grupp, vilket är fallet i en ZIC[®]-HILIC-kolonn. Den funktionella gruppen är av typen *sulfobetain* (figur 4). ZIC[®]-HILIC-kolonnen ger en effektiv separation på sura, basiska samt neutrala hydrofila föreningar [18].

Metaboliter som utsöndras i urin är vanligtvis väldigt små och polära och ett bra alternativ att analysera dem med är därför ZIC[®]-HILIC-kolonner [20].



Figur 4 - Funktionella gruppen sulfobetain i ZIC[®]-HILIC [18]

Tidigare har man vanligtvis använt HILIC till att bestämma kolhydrater och peptider, men nu har man även gjort försök på små polära föreningar, såsom läkemedel, toxiner och andra komponenter viktiga i livsmedels- och läkemedelsindustrier [19].

1.6.2 Masspektrometri

Masspektrometern är den mest specifika detektorn bland alla LC-detektorer. Den används flitigt i samband med kromatografi; GC såväl som LC. MS är en detektor som ger både kvalitativ och kvantitativ information.

En masspektrometers arbetssätt bygger på att jonisera molekyler. Efter jonisering sker en sortering med avseende på jonernas massa/laddning (m/z).

Huvudkomponenterna i en masspektrometer är *jonkällan*, som joniserar molekylerna, *analysatorn*, som sorterar jonerna och *detektorn* som detekterar jonerna. Det finns olika typer av jonkällor och analysatorer [17]:

Jonkälla:

- Elektrospray
- APCI (Kemisk jonisering i atmosfärstryck)
- APPI (Fotojonisering i atmosfärstryck)

Analysator:

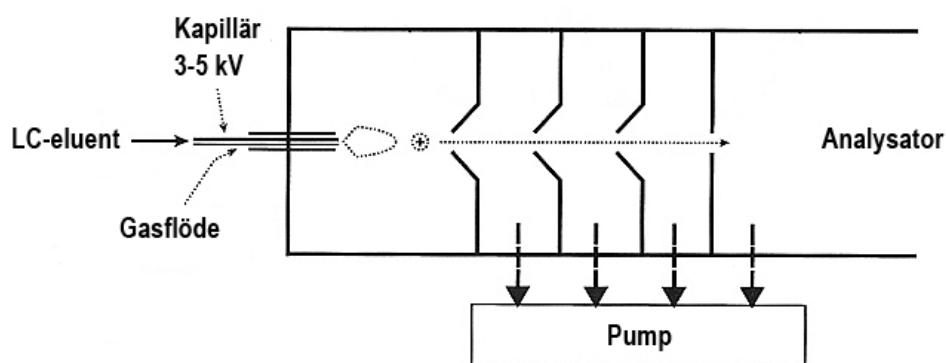
- Kvadrupol
- Time-of-flight (TOF)
- Ion trap
- Fourier transform-ion cyclotron resonance

I detta examensarbete är masspektrometern uppbyggd av en elektrospray kopplad till en trippelkvadrupol. Nedan kommer respektive väsentlig del av instrumentet att beskrivas.

1.6.2.1 Elektrospray

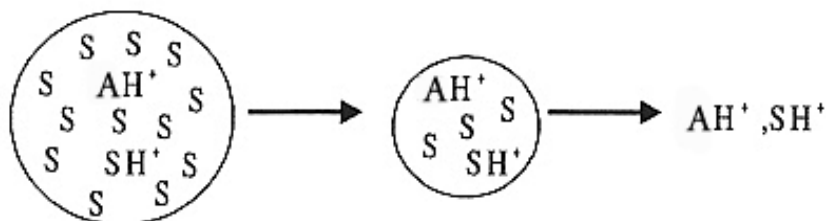
Analyten som elueras från kolonnen och som ska bestämmas i masspektrometern befinner sig oftast i en lösning, t ex metanol eller acetonitril. Lösningsmedlet måste evaporeras bort eftersom det är vakuum inuti instrumentet [21].

Lösningen pumpas genom en kapillär som har en positiv eller negativ potential (3-5 kV), vilket producerar positiva/negativa joner (figur 5). Ett uppvärmt gasflöde och den kraftiga spänningen på kapillären skapar en spray bestående av väldigt små droppar (nebulisation). Det elektriska fältet orsakar en dissociering av analytmolekylerna, medan gasens uppgift är att evaporera lösningsmedlet från dropparna.



Figur 5 - Schematisk figur på elektrosprayen [5]

Innan jonerna når analysatorn går sprayen genom en uppvärmd evaporeringskammare. När dropparna går genom denna kammare kommer lösningsmedlet att ytterligare evaporeras från dropparnas yta vilket får till följd att dropparna minskar i storlek och laddningsdensiteten ökar. När laddningsdensiteten ökar kommer lika laddade joner att repelleras från varandra och jonerna frisläppas från droppen [5, 17, 21] (figur 6).



Figur 6 - Laddningsdensiteten i partikeln ökar vilket medför en repellering av lika laddade joner (A är analyten, S står för ”solvent”, H^+ är protonen) [5]

Analyterna som från början befann sig i en lösning har alltså i masspektrometern extraherats från lösningsmedlet och omvandlats till joner [21].

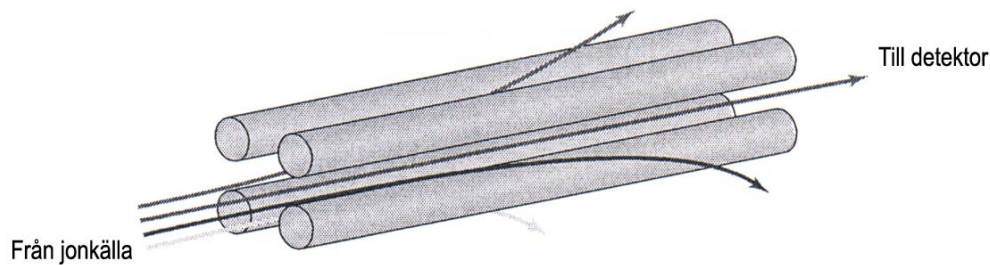
Vanliga joner vid positiv jonisering är protonerade joner $[MH]^+$ samt natrium och kaliumaddukter ($[MNa]^+$, $[MK]^+$).

Vid analys av stora biomolekyler, såsom proteiner, peptider och oligonukleotider, är elektropray en utmärkt teknik. Elektropray klarar även av att analysera mindre molekyler [5, 17].

1.6.2.2 Kvadrupol

Bland alla analysatorer är kvadrupolen den enklaste och billigaste. En fördel med kvadrupolen är att den kan jobba i både SCAN- och SIM-läge. I SCAN-läget skannar den igenom alla m/z i spektrat. I SIM-läget väljer man vilka m/z den ska skanna på. SCAN-läget används vanligtvis i kvalitativt syfte, medan SIM används i kvantitativt syfte.

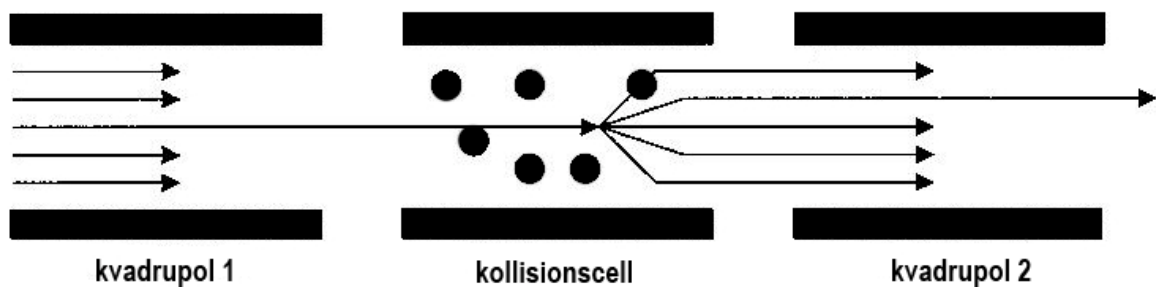
Kvadrupolen består av fyra parallella stavar som bildar en kvadrat. Jonerna som ska skannas passerar genom centret medan övriga får ut mellan stavarna (figur 7). Till stavarna lägger man på en spänning som genererar ett elektromagnetiskt fält, vilket i sin tur bestämmer vilka m/z joner som får nå detektorn.



Figur 7 - En schematisk figur på en trippelkvadrupol [17]

Vid tandem MS (MS/MS) används två kvadrupoler som analysatorer. Mellan kvadrupolerna finns en kollisioncell där jonerna fragmenteras genom att kollidera med en gas [17].

Vid "Multiple Reaction Monitoring" (MRM) i tandem MS är kvadrupolerna inställda på olika spänningar. De här spänningarna styr vilka joner som får nå detektorn och släpper alltså enbart igenom specifika joner. MRM fungerar enligt principen som beskrivs i figur 8 [22].



Figur 8 - Principskiss för MRM [22]

2 Målsättning

I detta avsnitt följer examensarbetets målsättningar.

- Utveckla HILIC-MS/MS-metod för bestämning av kotinin/nikotin i biologiska prover
- Jämföra två upparbetningsmetoder; extraktion och filtrering
- Studera totala mängden kotinin i biologiska prover (fri kotinin och bunden kotinin)
- Studera hur mängden kotininkonjugater (d v s bunden kotinin) förhåller sig med tiden

3 Material och metoder

3.1 LC-MS/MS

För bestämning av kotinin har en masspektrometer, Quattro-LC (Waters, Altrincham, Cheshire, UK) med elektroprayjonisering använts. Argon har använts som kollisionsgas. Kon- och kapillärspänningen optimerades och sattes till 20,0 V resp 5 kV.

Temperaturen på jonblocket var 130 °C och den uppvärmda gasens temperatur 200 °C. Gasen var N₂.

Kollisionsenergin optimerades och sattes till 25 eV. MRM har använts vid insamling av data för följande joner:

- kotinin: m/z 177 $[M+H]^+ \rightarrow 80$
- D₃-kotinin: m/z 180 $[M+H]^+ \rightarrow 80$

Quattro-LC var kopplad till en Shimadzu HPLC Pump LC 10AD VP (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Provfokusering gjordes genom att omge en provplugg på 5,000 µl/1,000 µl med 20 µl/24 µl fokuseringsvätska (acetonitril). Detta gjordes med hjälp av PAL CTC Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) i en 25 µl loop. (V_{inj} för extraherad urin samt för serum = 5,000 µl; V_{inj} för filtrerad urin = 1,000 µl)

För bestämning av kotinin utfördes en gradienteluering genom att använda mobilfas

- A: 95/5 acetonitril/H₂O + 0,05 % myrsyra
- B: 95/5 H₂O/acetonitril + 0,05 % myrsyra

Mobilfaserna hade en flödes hastighet på 0,03 ml/min. Bestämning av kotinin startades med en eluering från 20 % till 80 % B i 16 min.

HILIC-kolonnen som användes var en ZIC[®]-HILIC, 5 µm, 1.0 mm I.Dx15 cm.

3.2 Övrigt

Indunstaren som användes till att indunsta prover var en Savant Speed Vac[®] Plus SC210A. Centrifugering av prover gjordes med en Jouan C312 med varvtal 3000 rpm.

3.3 Standardlösning

Kotininstandard: 100 ng kotinin/ml H₂O

Internstandard (IS): 100 ng D₃-kotinin/ml H₂O

3.4 Förvaring

Prover som inte analyserats direkt har förvarats i +8 °C i högst en månad.

3.5 Upparbetning

I studien har två biologiska matriser studerats och två upparbetningsmetoder har tillämpats.

- Extraktion med metylenklorid (befintlig metod [23])
 - urin
 - serum
- Filtrering av urin

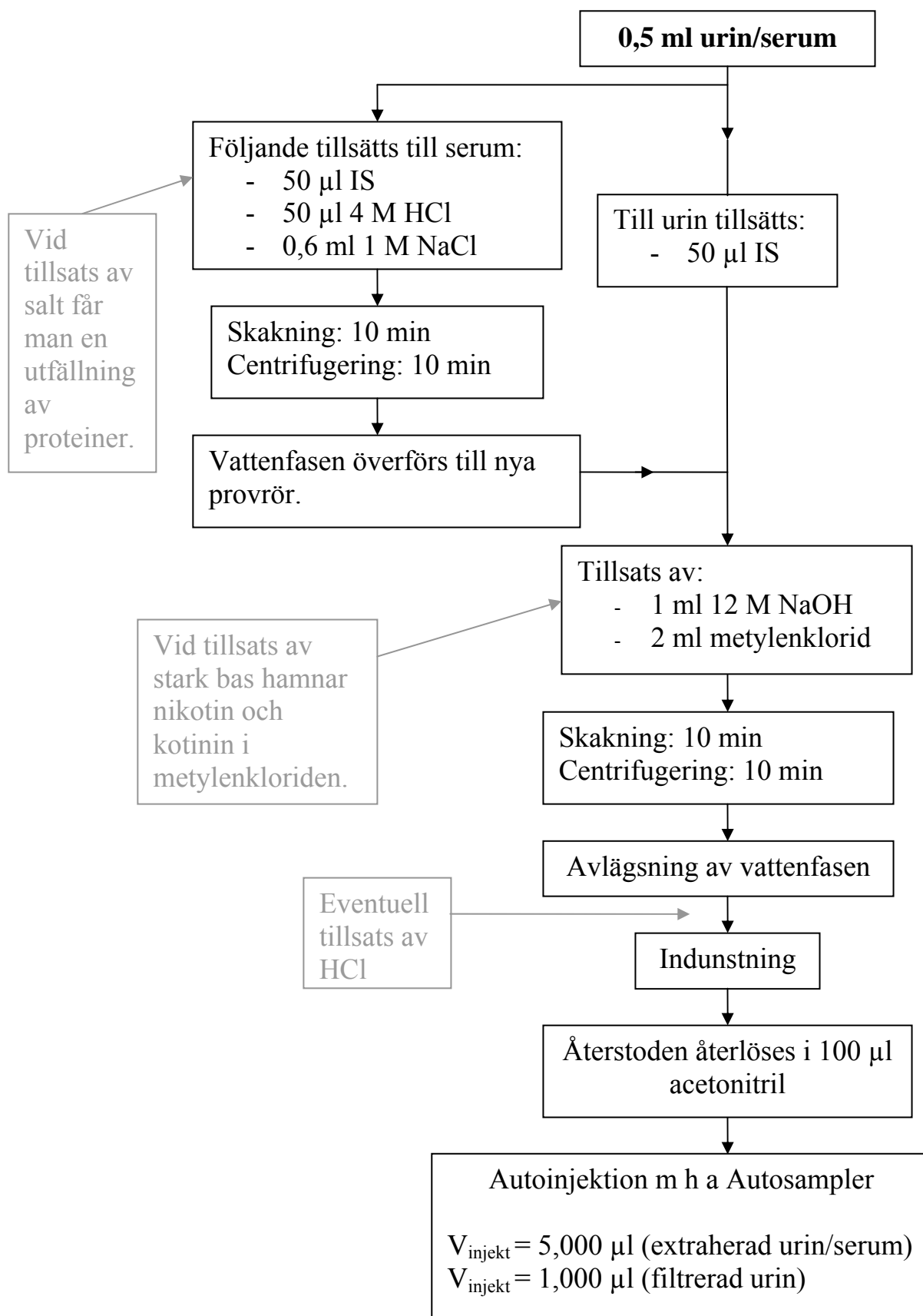
3.5.1 Extraktion med metylenklorid

För kalibreringslösningar spikades kotinin till blankurin eller serum enligt tabell 1 och 2 i appendix 1.

Till 0,5 ml urin tillsattes 5 ng D₃-kotinin, 1 ml 12 M NaOH och 2 ml metylenklorid. Vid tillsats av bas tvingades de annars vattenlösliga analyterna att hamna i organiska fasen. Efter skakning och centrifugering avlägsnades vattenfasen och den organiska fasen överfördes till nya provrör. Därefter indunstades metylenkloriden som är ett lättflyktigt organiskt lösningsmedel. Tillsats av saltsyra (HCl) (0 – 50 µl) för att förhindra avdunstning av kotinin studerades.

Vid provberedning av plasma/serum krävdes förutom ovanstående extraktion även en extraktion i början med 4 M saltsyra (HCl) och 1 M natriumklorid (NaCl) för att fälla ut proteiner från blodet. Man kan bortse från detta steg för urin som är ett relativt proteinfritt biologiskt material.

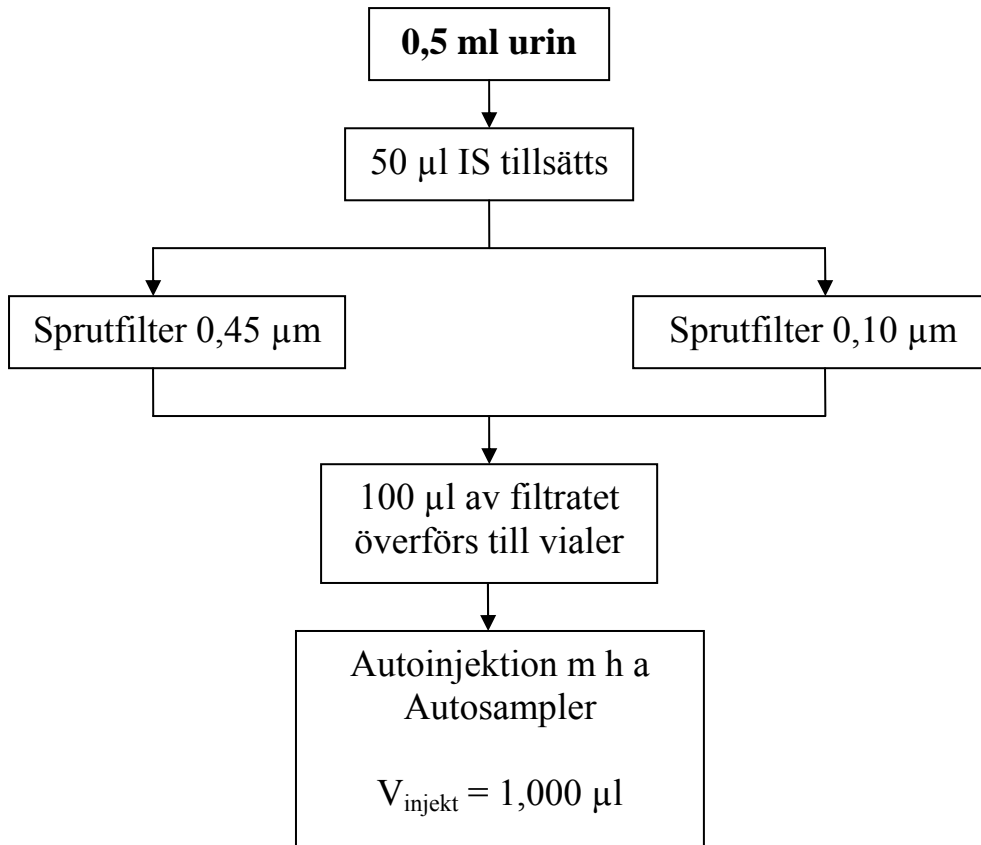
Efter indunstning tillsattes 100 µl acetonitril för att återlösa analyterna. Proverna överfördes därefter till vialer för analys med LC-MS/MS (figur 9).



Figur 9 - Schematisk beskrivning av vätske-vätske-extraktion av urin/serum som provberedning

3.5.2 Filtrering

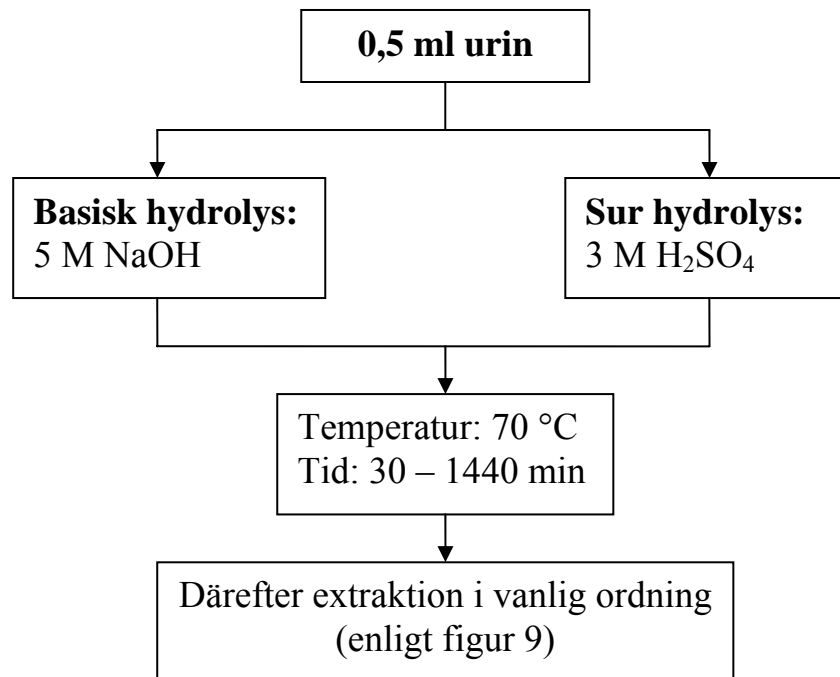
Till 0,5 ml urin tillsattes 5 ng D₃-kotonin. Blandningen skakades i 10 min innan filtrering (sprutfilter 0,45 µm eller 0,10 µm). Efter filtrering pipetterades 100 µl av filtratet till vialer för analys med LC-MS/MS (figur 10).



Figur 10 - Schematisk beskrivning av filtrering som uppberedningsmetodik av urin

3.6 Hydrolysis

För att undersöka nedbrytning av kotininkonjugat till fri kotinin studerades olika hydrolysbetingelser vid hydrolysis av urin från exponerade personer (figur 11).



Figur 11 - Schematisk beskrivning av hydrolysis av urin

3.7 Förhållandet mellan bunden och fri kotinin

Syftet var att studera förhållandet mellan bunden och fri kotinin i relation till exponering och provtagningstillfälle.

Den fria kotininen bestämdes genom att direkt extrahera provet med metylenklorid. Bunden kotinin bestämdes genom att hydrolysera provet och sedan göra en extraktion med metylenklorid. Efter hydrolysis erhöles totala mängden kotinin.

Bunden kotinin = totala mängden kotinin – fri kotinin

I försöket deltog tre personer som exponerats för nikotin på olika sätt. Tabell 1 innehåller information såsom vad personen exponerats för, hur länge exponeringen pågått och när provtagningen skedde.

Prover samlades in i plasttuber under tre dagar.

	Tid efter exponering (min)
Person 1: Nicorette-tuggummi (2 mg) (tuggade i 5-10 min)	0
	60
	300
	1440
	2880
Person 2: rökte i ~10 min	0
	60
	300
	1440
	2880
Person 3: Snusade i ~45 min	0
	150
	210
	1880

Tabell 1 - Beskriver vid vilka tider provtagningar har skett. Nollprovet återspeglar mängden kotinin hos personen före exponering.

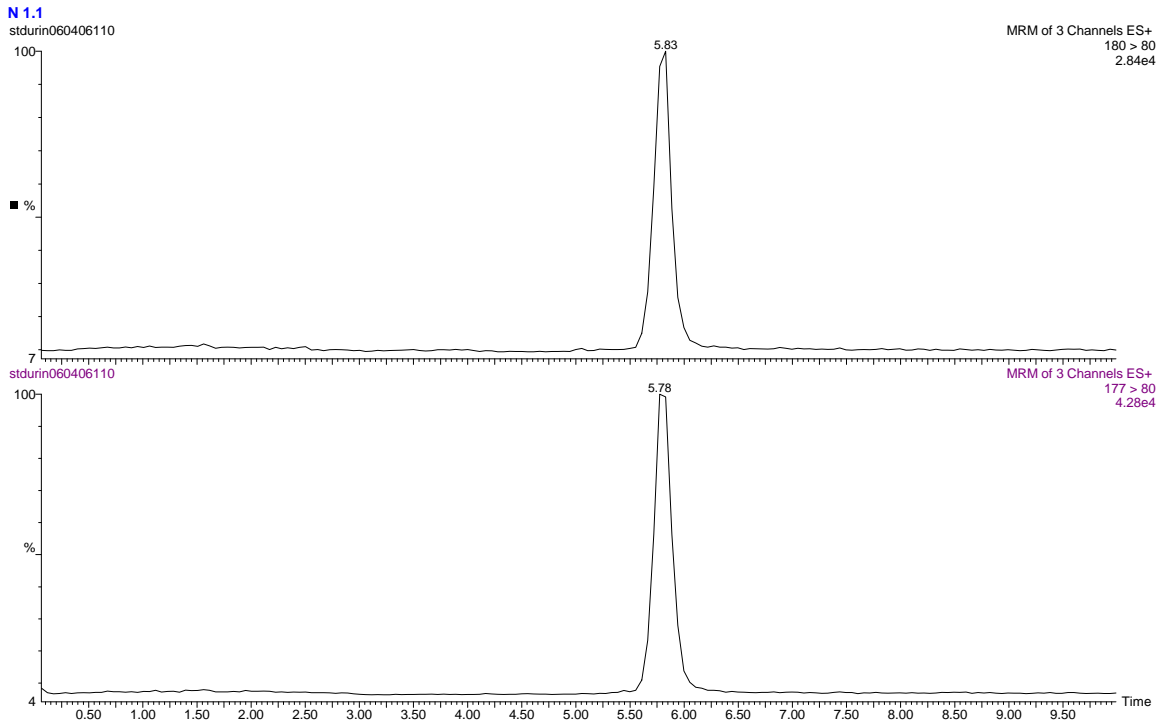
4 Resultat och diskussion

4.1 Kromatografi

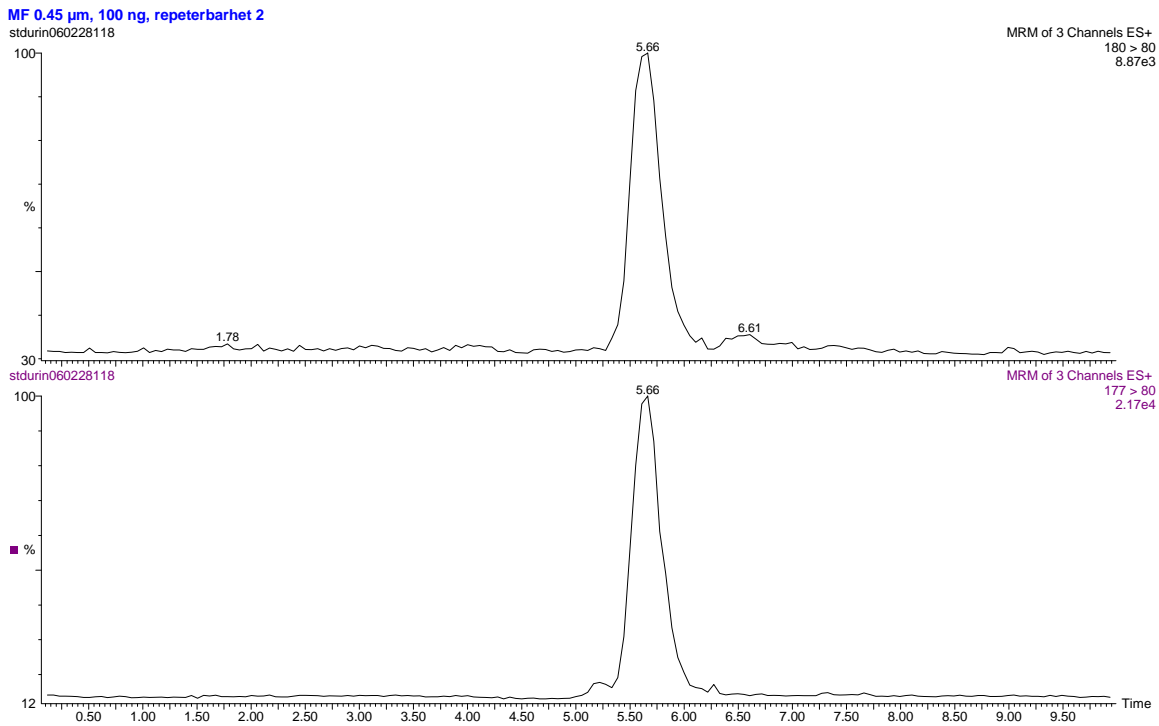
Prover extraherade med metylenklorid gav kromatogram utan några interfererande toppar. Retentionstiden för kotinin och D₃-kotinin var 5,8 min för den aktuella gradienten (figur 12).

För filtrerad urin erhålls en betydligt stökigare matris och kromatogrammen innehöll en del extra toppar som kan störa vid kvantifiering av låga halter. Retentionstiderna var aningen lägre för filtrerad urin, vilket beror på att en vattenlösning injicerats (figur 13).

Fokuseringseffekten då kotinin var löst i acetonitril, för de extraherade proverna, var tydlig. Betydligt smalare toppar erhöles för de extraherade proverna även om bara 1 µl injicerats för de filtrerade, jämfört med 5 µl för de extraherade.



Figur 12 - Urin som extraherats. Översta kromatogrammet är på D₃-kotinin. Understa är på kotinin.

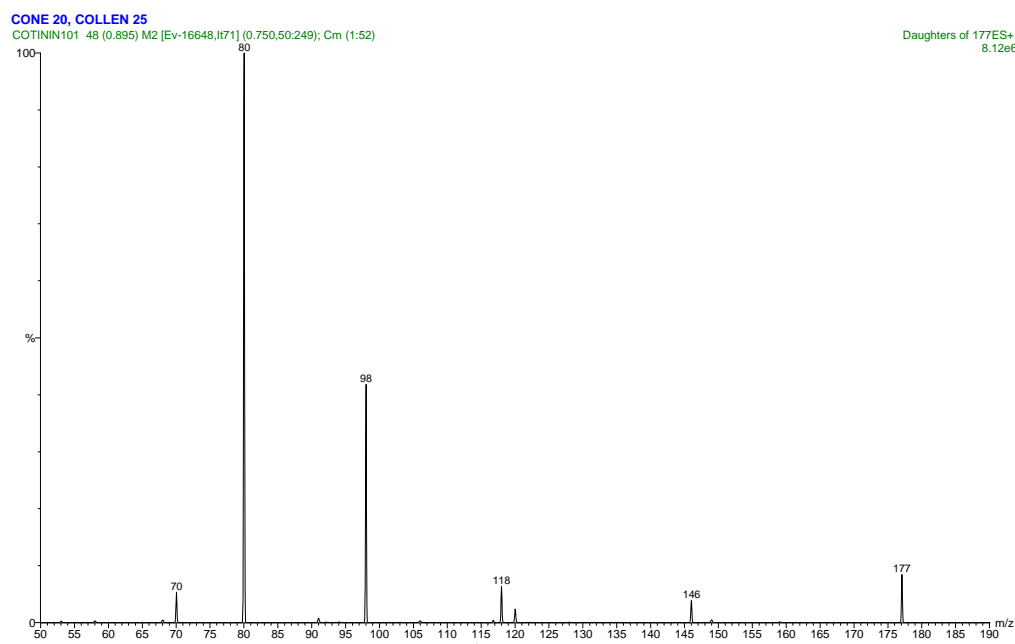


Figur 13 - Urin som filtrerats. Översta kromatogrammet är på D₃-kotinin. Understa är på kotinin.

4.2 Masspektrometri

Kollisionsenergi, konspänning och övriga instrumentparametrar optimerades med direktinjektion med sprutpump.

Dotterjonspektret av $m/z = 177$ ($[MH^+]$) för kotinin innehöll många fragment (figur 14). Det starkaste var $m/z = 80$, protonerad pyridylgrupp. För MRM-bestämning sattes $m/z = 177$ till ”parent ion” och $m/z = 80$ till ”daughter ion”.



Figur 14 - Dotterjonspektret av 177 ($[MH^+]$) för kotinin

4.3 Upparbetning

4.3.1 Extraktion

Tillsats av HCl hade ingen påverkan på avdunstningen av kotinin. Därför tillsattes i fortsättningen ingen HCl vid indunstningen.

Efter indunstning hade provet anrikats 5 gånger (provvolymen var från början $500 \mu\text{l}$, efter indunstning återlöstes återstoden i $100 \mu\text{l}$ acetonitril).

4.3.2 Filtrering

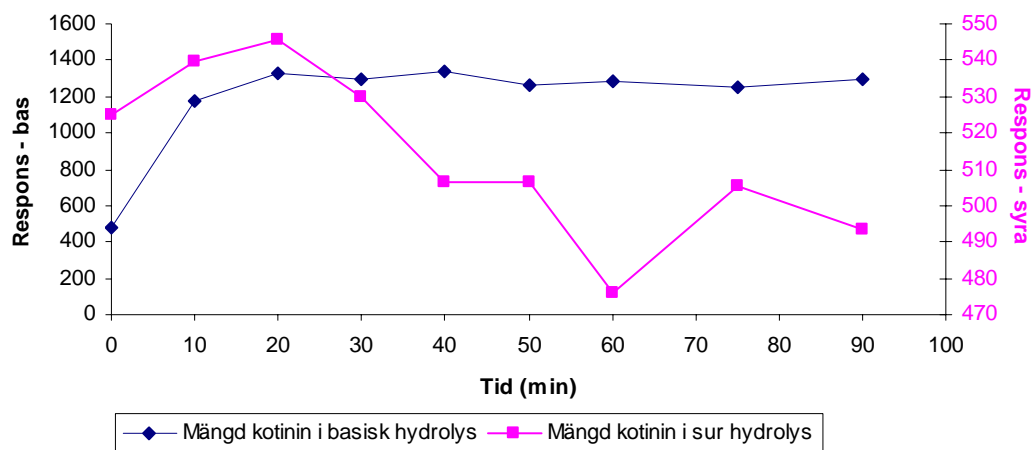
Filtrering var en snabb uppberedningsmetodik, men nackdelen, i jämförelse med extraktion av kotinin, var att filtrerade prover hade en lägre känslighet p g a att:

- det inte skedde någon anrikning
- man hade en mindre injektionsvolym p g a att provet var i vattenlösning
- man fick bredare toppar p g a vattenlösning
- man hade ett högre brus p g a matriseffekt

4.4 Hydrolyys

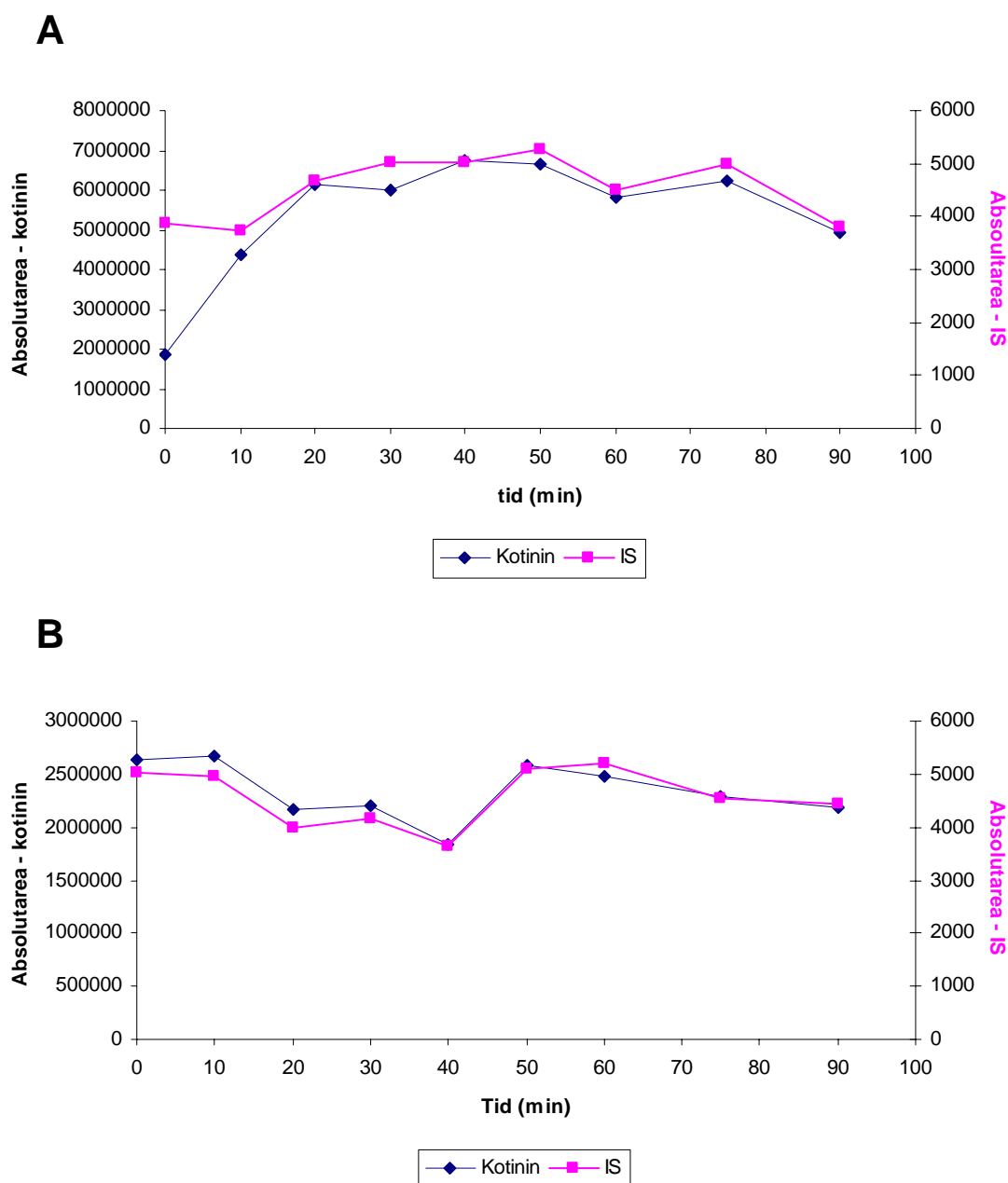
Kotininkonjugat konverterades till kotinin vid hydrolyys av provet i 70 °C och 30 min.

Tydliga skillnader mellan sur och basisk hydrolyys kunde urskiljas. I den basiska hydrolysen steg responsen redan under de 20 första minuterna, medan responsen från den sura hydrolysen sjönk för att sedan vara stabil. Den basiska hydrolysen var därför effektivast. Efter 30 – 40 min basisk hydrolyys hade den totala mängden kotinin i provet ökat med 80-90 % (figur 15).



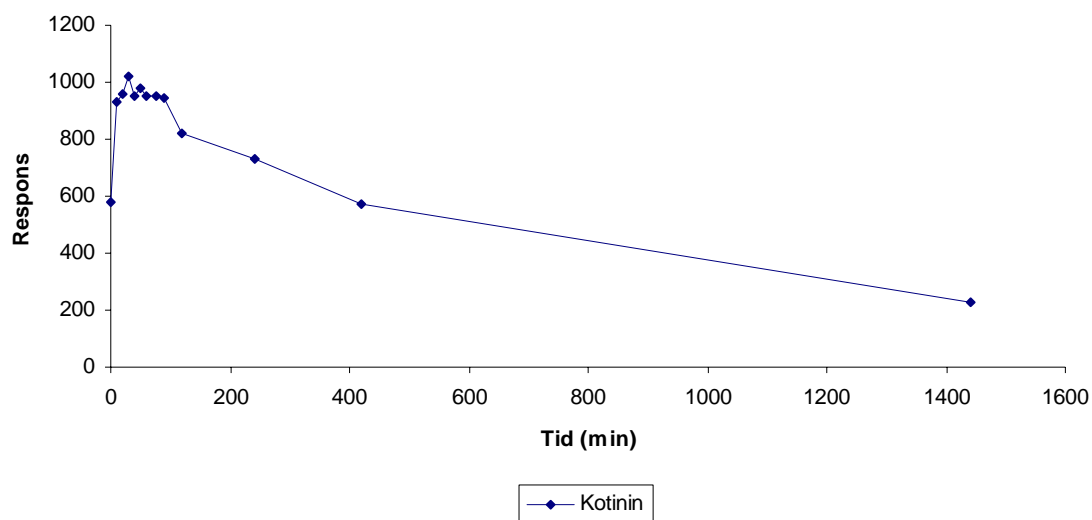
Figur 15 - Basisk och sur hydrolyys jämförs. Basen ger en effektivare hydrolyys än syran. Responsen i y-axlarna avser kvoten mellan $area_{kotinin}$ och $area_{IS}$. Den vänstra y-axeln ger responsen som man erhåller från den basiska hydrolysen. Den högra axeln är respons från den sura hydrolysen.

Figur 16 visar variationerna för kotinin och IS under 90 min. Figur 16 A är ett diagram på den basiska hydrolysen och figur 16 B är på den sura hydrolysen. Figur 16 A och B visar att analyt och IS följs åt, d v s båda påverkas likadant av hydrolyys. Men för basisk hydrolyys ser man en ökning av analyt i början medan IS är relativt konstant, detta visar en nedbrytning av kotininkonjugat till fri kotinin.



Figur 16 - Diagrammen visar hur absolutarean för kotinin och IS varierar med tiden 0 till 90 min. IS:en betar sig på samma sätt som analyten. Diagram A är på den basiska hydrolysen, diagram B är på den sura hydrolysen.

För att undersöka hur kotinin beter sig under en längre tids hydrolyt gjordes ett hydrolysförsök på 24 h. I början av hydrolysen ökade kotinin, vilket fortsatte fram till tiden ~ 40 (som tidigare). En längre tids hydrolyt hade dock en negativ effekt på analyten. Efter försök som utförts kunde man konstatera en gradvis nedbrytning av fri kotinin efter drygt 1 h hydrolyt. Kotinin som hade frigjorts från konjugatet bröts på så sätt, i fri form, ner till någonting annat (figur 17).



Figur 17 - Basisk hydrolys som visar $\text{area}_{\text{kotinin}}/\text{area}_{\text{IS}}$ avsett mot tiden i minuter under en period på 24 h.

4.5 Kvantifiering

4.5.1 Kvantifiering

Standardkurvorna för extraherad urin, filtrerad urin samt för serum/plasma visas i figur 1-3 (appendix 2). Figur 1 och 3 visar kalibreringskurvan för kotinin i området 0 – 10 ng kotinin och figur 2 i området 0 – 100 ng kotinin.

Samtliga kalibreringskurvor har en regressionskoefficient (r^2) på 0,999 och detta tyder på att det råder bra linjäritet inom det aktuella haltområdet.

4.5.2 Repeterbarhet

Vid injicering av ett och samma prov tio gånger bestämdes de resp metodikernas standardavvikelser (tabell 2). 0,5 ml urin spikades med 10 ng kotininstandard samt 10 ng IS.

	Relativ standardavvikelse
Extraktion	2,76 %
Filtrering – 0,45μm	3,45 %
Filtrering – 0,10μm	5,66 %

Tabell 2 - Relativa standardavvikelser då ett och samma prov injicerades tio gånger

Följande resultat kunde man erhålla genom att tio identiska prover bereddes (tabell 3). Samtliga prover spikades även här med 10 ng kotininstandard och lika mycket IS. Extraktionen gav lägst RSD medan båda filtreringarna hade dålig precision. Den dåliga precisionen från de båda filtreringarna berodde på

att topparna från kromatogrammen var svåra att integrera p g a att proverna spikades med för låga koncentrationer. Hade man spikat proverna i högre koncentrationer hade precisionen förmodligen blivit lägre eftersom topparna hade blivit lättare att integrera.

	Relativ standardavvikelse
Extraktion	3,36 %
Filtrering – 0,45µm	10,43 %
Filtrering – 0,10µm	17,33 %

Tabell 3 - Relativa standardavvikelser från tio identiska prover

Ovanstående data bevisar att denna HILIC-metod ger oss resultat med bra precision.

4.5.3 LOD

Den lägsta detekterbara mängd av kotinin bestämdes till $9,2 \cdot 10^{-2}$ pg.

Detektionsgränsen definierades som den mängd kotinin som ger en signal som är 3 gånger bruset ($S/N = 3$) beräknat med RMS (Root Mean Square).

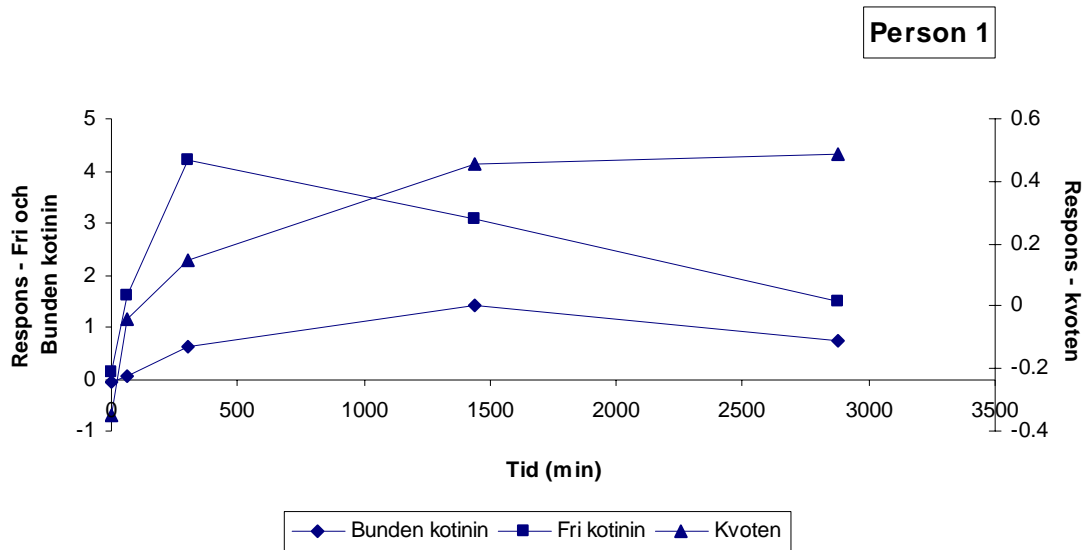
4.6 Förhållandet mellan bunden och fri kotinin

Vad man kunde urskilja hos de tre exponerade personerna var att bunden kotinin samt fri kotinin ökade i början ända tills ett optimum nåddes. Tog man prover som befann sig för långt ifrån exponeringstiden minskade den fria kotininen medan bunden kotinin blev konstant (figur 18-20).

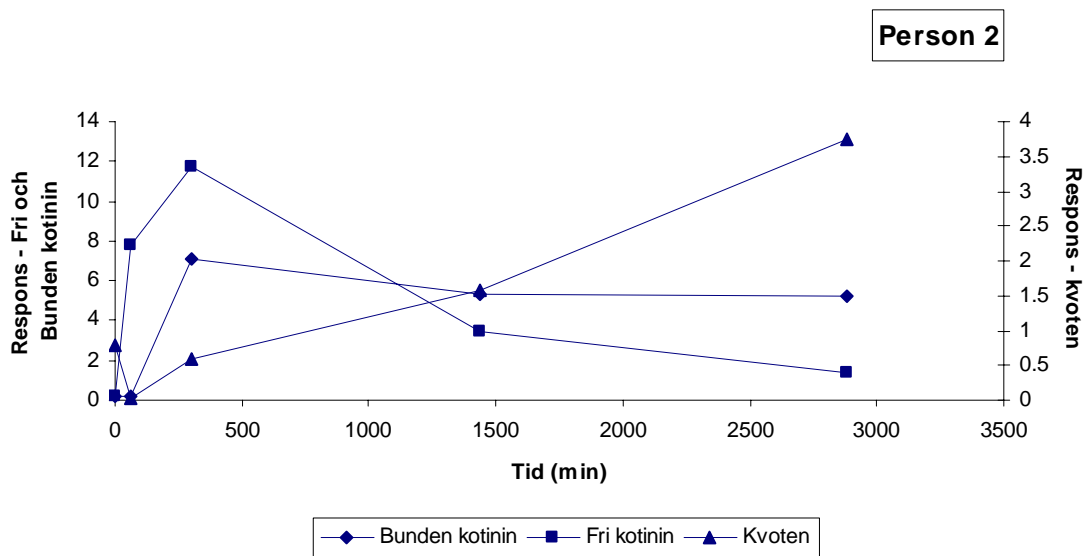
Den fria kotininens successiva minskning berodde på:

- Nedbrytningen
- Konjugeringen

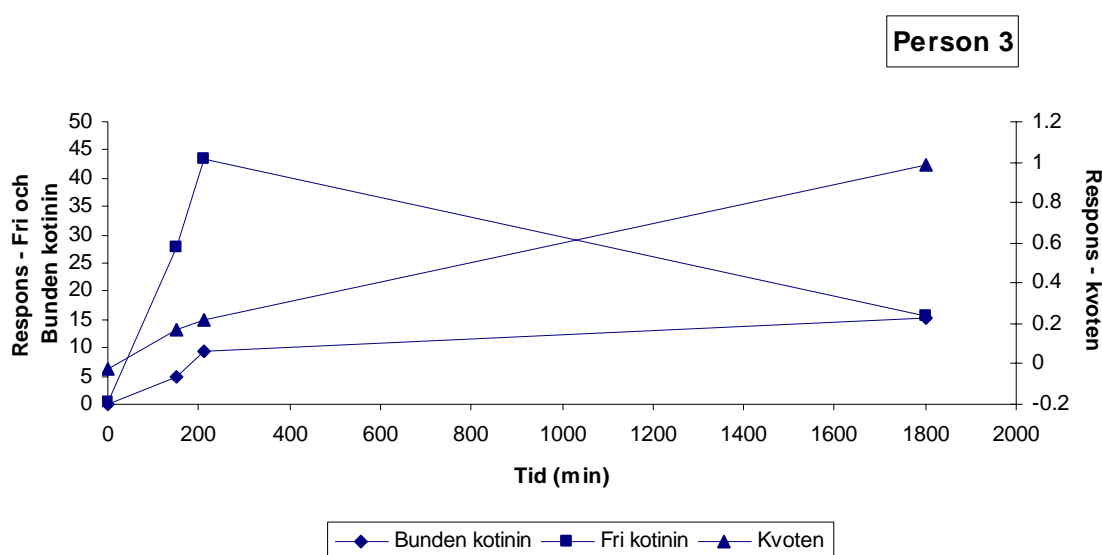
Kvoten mellan bunden och fri kotinin ökade också till en början, men för Person 1 kunde man redan se en plåtå i det fjärde provet. Person 2 och 3 kommer också att nå en plåtå, fast lite senare; detta för att de två exponerats för mer nikotin än vad Person 1 exponerats för.



Figur 18 - Diagram för Person 1 som tuggade Nicorette-tuggummi. Responsen på y-axlarna avser kvoten mellan $area_{\text{kotinin}}$ och $area_{\text{IS}}$.



Figur 19 - Diagram för Person 2 som rökte. Responsen på y-axlarna avser kvoten mellan $area_{\text{kotinin}}$ och $area_{\text{IS}}$.



Figur 20 - Diagram för Person 3 som snusade. Responsen på y-axlarna avser kvoten mellan $area_{kotinin}$ och $area_S$.

Figur 18 – 20 beskriver följande:

- Hur mängden bunden kotinin varierar med tiden efter exponering
- Hur mängden fri kotinin varierar med tiden efter exponering
- Hur kvoten mellan bunden kotinin och fri kotinin varierar med tiden efter exponering

Följande halter av kotinin uppnåddes bland personerna:

Person 1: 7 ng kotinin/0,5 ml urin

Person 2: 19 ng kotinin/0,5 ml urin

Person 3: 70 ng kotinin/0,5 ml urin

Snus gav högre halt av kotinin än rökning. Lägst halt erhöles från tuggummi.

För att korrekt kunna jämföra mängden kotinin i olika urinprover bör man antingen samla in exakta dygns mängder urin eller relatera mängden kotinin till mängden kreatinin i ett prov. Kreatinin bildas vid muskelnedbrytningen och är korrelerad till muskelmassan hos en individ. För att korrigera för utspädningen av urinen borde den bestämda kotininmängden anges per mol kreatinin.

Detta är en begränsad studie och justering för utspädning har inte gjorts.

5 Slutsatser

Utifrån resultaten i detta examensarbete visade sig den presenterade metoden, baserad på HILIC-MS/MS, för bestämning av kotinin i urin och serum vara selektiv och känslig. Metoden lämpar sig väl för att studera passiv rökning.

För att nå lägsta möjliga detektionsgräns krävs extraktion med metylenklorid. Som screening-metod skulle direkt filtrering av urin fungera utmärkt. Denna teknik kräver minimal uppärbetning, dock är den mindre känslig.

Det var en stor variation i mängden fri kotinin jämfört med kotininkonjugat i förhållande till exponeringstillfälle. Beroende på när provtagning sker i förhållande till exponeringstillfälle kan man få en stor variation om man mäter på fri kotinin. Att använda kotininkonjugat som markör för nikotinexponering skulle kunna ge en stabilare bild av nikotinexponering.

6 Referenser

- [1] Baidoo EE.K. et al, *Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis – mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, 796 (2003) 303-313
- [2] Dhar P., *Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35 (2004) 155-168
- [3] Kim I.; Darwin WD.; Huestis MA., *Simultaneous determination of nicotine, cotinine, nornicotine, and trans-3'-hydroxycotinine in human oral fluid using solid phase extraction and gas chromatography – mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, 814 (2005) 233-240
- [4] Willers S., *Environmental Tobacco Smoke – Cotinine in urine as a biomarker and some effects*, Lund University, Sweden (1994)
- [5] Gorrod J.W; Jacob III P., *Analytical determination of nicotine and related compounds and their metabolites*, Elsevier Science B.V., Netherlands (1999)
- [6] Willers S.; Gerhardsson L.; Lundh T., *Environmental tobacco smoke (ETS) exposure in children with asthma – relation between lead and cadmium, and cotinine concentrations in urine*, Respiratory Medicine (2005) 99, 1521-1527
- [7] Meger M. et al, *Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, 778 (2002) 251-261
- [8] Siegmund B. et al, *The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker*, Food Chemistry 74 (2001) 259-265
- [9] Ghosheh OA et al, *A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3'-hydroxycotinine and caffeine in the plasma of smokers*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23 (2000) 543-549
- [10] Ebbert JO. et al, *Cotinine as a biomarker of systemic nicotine exposure in spit tobacco users*, Addictive Behaviours 29 (2004) 349-355

- [11] Xu X.; Iba MM.; Weisel CP., *Simultaneous and Sensitive Measurement of Anabasine, Nicotine, and Nicotine Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry*, *Clinical Chemistry* 50:12 2323-2330 (2004)
- [12] Xu AS, *Determination of nicotine and cotinine in human plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization interface*, *Journal of Chromatography B*, 682 (1996) 249-257
- [13] de Weerd S. et al, *Variation of Serum and Urine Cotinine in Passive and Active Smokers and Applicability in Preconceptional Smoking Cessation Counseling*, *Environmental Research Section A* 90, 119-124 (2002)
- [14] Ho-Sang Shin et al, *Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in humane urine, plasma and saliva by gas chromatography – mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, 769 (2002) 177-183
- [15] Stolker AA.M. et al, *Determination of nicotine and cotinine in rat plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1020 (2003) 35-43
- [16] Harris D.C., *Quantitative Chemical Analysis (Sixth Edition)*, W.H. Freeman and Company, United States of America (2003)
- [17] *Basics of LC/MS*, Agilent Technologies (2001)
- [18] *A Practical Guide to HILIC*, SeQuant Innovators in Chemical Analysis (2005)
- [19] Guo Y.; Gaiki S., *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*, *Journal of Chromatography A*, 1074 (2005) 71-80
- [20] Idborg H. et al, *Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, 828 (2005) 9-13
- [21] Johnstone RA.W.; Rose ME., *Mass spectrometry for chemists and biochemists (Second Edition)*, Cambridge University Press, Australia (1996)

[22] Mowitz M., *Analys av fenolföreningar från termisk nedbrytning av epoximaterial med vätskekromatografi-masspektrometri*, Stockholms Universitet, Sweden (2005)

[23] Lindgren T et al, *Urinary cotinine concentration in flight attendants, in relation to exposure to environmental tobacco smoke during intercontinental flights*, *Int Arch Occup Environ Health* (1999) 72: 475-479

Appendix 1

Tabell 1

Kalibreringslösningar för extraherad urin och serum bereddades enligt:

	Urin/Serum* (ml)	Kotininstandard (µl)	Internstandard (µl)
Blank	0,5	0	0
1	0,5	0	50
2	0,5	2,5	50
3	0,5	5,0	50
4	0,5	10	50
5	0,5	20	50
6	0,5	50	50
7	0,5	100	50

Tabell 2

Kalibreringslösningar för filtrerad urin bereddades enligt:

	Urin (ml)	Kotininstandard (µl)	Internstandard (µl)
Blank	0,5	0	0
1	0,5	0	500
2	0,5	25	500
3	0,5	50	500
4	0,5	100	500
5	0,5	200	500
6	0,5	500	500
7	0,5	1000	500

* I försöket användes kalvserum

Appendix 2

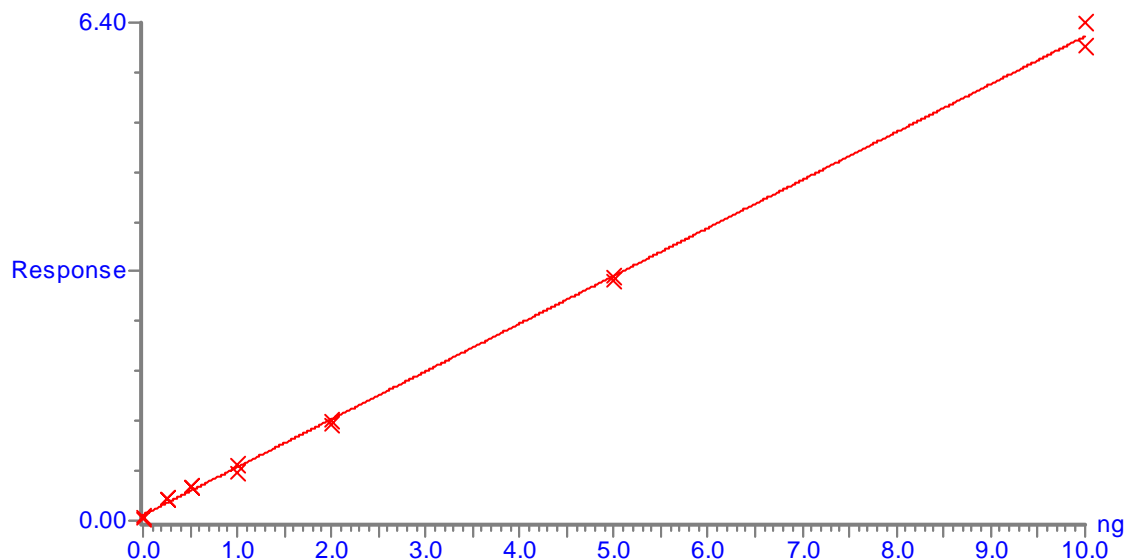
Compound name: cotinine

Correlation coefficient: $r = 0.999340$, $r^2 = 0.998681$

Calibration curve: $0.615257 * x + 0.0733928$

Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Figur 1 - Standardkurva för extraherad urin

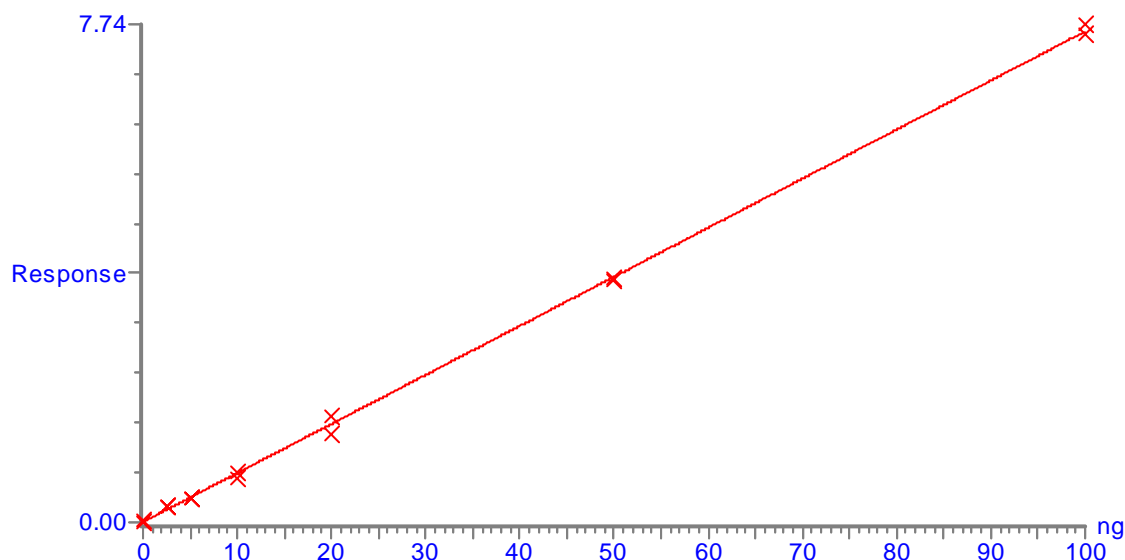
Compound name: cotinine

Correlation coefficient: $r = 0.999620$, $r^2 = 0.999240$

Calibration curve: $0.0762181 * x + 0.00463478$

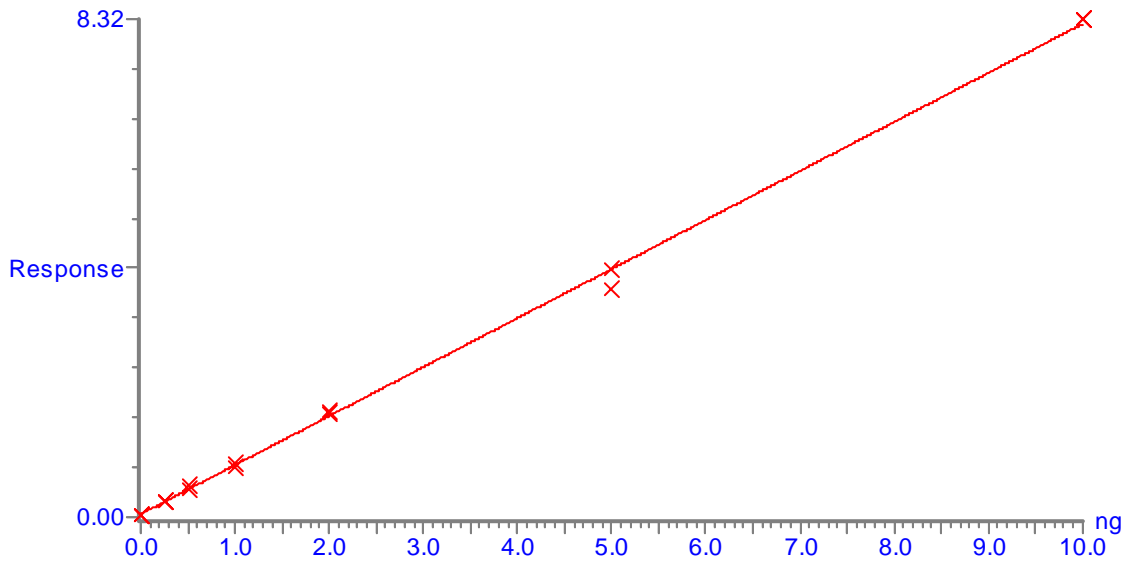
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)

Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Figur 2 - Standardkurva för filtrerad urin genom 0,45 µm sprutfilter

Compound name: cotinine
Correlation coefficient: $r = 0.999374$, $r^2 = 0.998749$
Calibration curve: $0.818856 * x + 0.0521321$
Response type: Internal Std (Ref 1), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Figur 3 - Standardkurva för serum