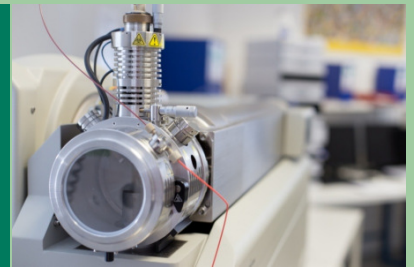


Monitoring des Tabakkonsums: Evaluierung einer LC-MS/MS-Applikationsvorschrift zur Analytik von Nicotin und Cotinin im Urin

Sandra Gläser und Christoph Geffert*

Labor Staber | Abteilung Toxikologie

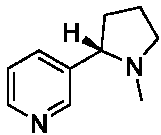
www.labor-staber.de | *Telefon +49 35204 63 50; Email: c.geffert@staber-kollegen.de



1 Einleitung

Nicotin zählt zu den Alkaloiden und kann aus der Tabakpflanze gewonnen werden. Es wird während des Rauchens von Tabakwaren inhalativ aufgenommen und ist für das äußerst hohe Abhängigkeitspotential hauptverantwortlich. Die Wirkung ist stark dosisabhängig: In geringen Konzentrationen besitzt es vornehmlich eine stimulierende Wirkung, in mittleren ist die Wirkung hingegen entspannend. In hohen Dosierungen wirkt es neurotoxisch. Nicotin wird zu dem Hauptmetaboliten Cotinin oxidiert, das noch weiter umgewandelt werden kann. Abhängig vom pH-Wert werden 4 - 10 % des aufgenommenen Nicotins unverändert wieder ausgeschieden. Eine Unterscheidung zwischen Rauchern und Nichtrauchern kann anhand der Cotinin-Konzentration im Urin erfolgen. Cotinin lässt sich dort typischerweise noch einige Tage nach dem Tabakkonsum nachweisen, wobei anhand der Urinkonzentration eine Einteilung in geringfügiges bzw. passives, moderates und starkes Rauchen möglich ist. Aus diesem Grund fordern private Lebens- und Krankenversicherer nicht selten eine Cotinin-Untersuchung, um Raucher und Nichtraucher zu klassifizieren [1,2].

Nicotin



Cotinin

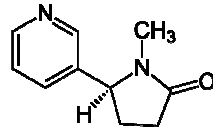


Abb. 1: Strukturformel des Nicotins und des Cotinins

2 Patienten/Methoden

Die Untersuchungen erfolgten auf Basis der Applikationsvorschrift „ClinMass® LC-MS/MS Applikation für Nicotin und -Metaboliten im Urin“, in Verbindung mit dem dazugehörigen ClinCal® Kalibrator-Set, den ClinChek® Qualitätskontrollen und dem internen Standard (Recipe, München) [3]. Als analytische Säule wurde eine Luna® 5 µm 250x4,6 mm C18(2) 100 Å (Phenomenex, Aschaffenburg) verwendet. Für die mobile Phase wurden 308 mg Ammoniumacetat in 400 ml Wasser und 600 ml Methanol gelöst. Die Aufarbeitung wurde dabei geringfügig modifiziert, um ggf. auch die Analyse von Serumproben zu ermöglichen. Bei der Aufarbeitung wurden zu je 100 µl Probe 100 µl Interner sowie 400 µl Methanol gegeben und die Lösung direkt in das Chromatographie-System injiziert.

Tabelle 1: Für die Diagnostik verwendete Massenübergänge, AB Sciex API 4000 Triple Quad™, ESI-Positivmodus

| Verbindung | MRM 1 | MRM 2 | IS (D ₃ -Derivat) |
|------------|---------------|---------------|------------------------------|
| Nicotin | 163.2 → 130.1 | 163.2 → 116.4 | 166.0 → 130.0 |
| Cotinin | 177.2 → 79.8 | 177.2 → 97.9 | 180.0 → 80.0 |

Tabelle 2: Systemeinstellungen für die HPLC, Agilent 1260 Infinity

| | | | |
|-------------------|------------|---------------|-------|
| Flussrate | 1.0 ml/min | Säulenofen | 40 °C |
| Injektionsvolumen | 10 µl | Methodenlänge | 6 min |

3 Ergebnisse

Sowohl im Fall des Nicotins als auch des Cotinins decken die Werte für die Bestimmungsgrenze und der Linearität die klinisch relevanten Bereiche (23,1 – 10100 bzw. 7,2 - 1870 µg/l) ab. Für die Festlegung der zu erwartenden Konzentrationsbereiche wurden Urinproben von 64 Rauchern ausgewertet. Die Bestimmungen der Wiederholgenauigkeiten in Serie (Intra-Assay; V_k < 4%) und an verschiedenen Tagen (Inter-Assay; V_k < 9%) ergaben akzeptable Werte. Matrixeffekte werden durch den Einsatz der Internen Standards weitestgehend kompensiert.

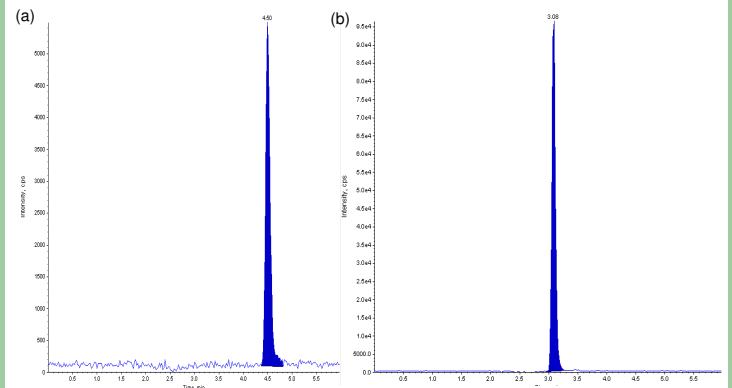


Abb. 2: Chromatogramm eines (a) Nicotin-Kalibrators (c = 101 µg/l) und eines (b) Cotinin-Kalibrators (c = 103 µg/l).

Tabelle 3: LLOD und LLOQ

Ermittlung anhand von Kalibrationsreihen mit aufgestockten Matrixproben

| Verbindung | LLOD (µg/l) | LLOQ (µg/l) |
|------------|-------------|-------------|
| Nicotin | 12 | 23 |
| Cotinin | 6.2 | 10 |

Tabelle 5: Linearität und Varianzhomogenität im relevanten Bereich

Linearität (Mandel-F-Test) und Varianzhomogenität (Cochran-Test) wurden für jeden Analyten anhand von Kalibrationsreihen (Nicotin: 60, 101, 250, 752, 1990, 5010, 10100; Cotinin: 10, 20, 30, 60, 103, 247, 718 und 1870 µg/l) geprüft. Die Proben jedes Konzentrationslevels wurden mehrfach aufgearbeitet (n = 6)

| Substanz | Linearität und Varianzhomogenität | |
|----------|-----------------------------------|-----------------|
| | MRM 1 | MRM 2 |
| Nicotin | 60 – 10100 µg/l | 60 – 10100 µg/l |
| Cotinin | 10 – 1870 µg/l | 10 – 1870 µg/l |

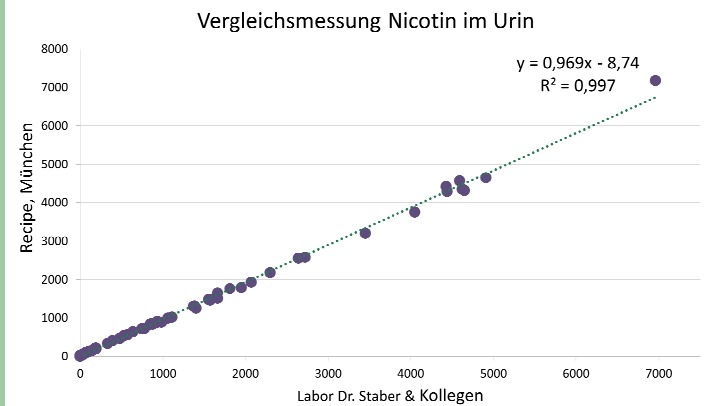


Abb. 3: Vergleichsmessung mit externem Labor, Beispiel Nicotin, 64 Urin-Proben. Im Fall des Cotinins wurde eine Korrelation von $r^2 = 0,97$ erhalten.

4 Schlussfolgerung

Die auf einer Recipe-Applikation basierende LC-MS/MS-Methode zur Analyse von Nicotin- bzw. Cotinin im Urin ist für das Monitoring des Tabakkonsums geeignet.

5 Literatur

[1] A. M. Gressner, T. Arndt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007, 68-69 [2] W.R. Külpmann, *Clinical Toxicological Analysis Volume 2*, 2009, WILEY-VCH Verlag [3] ClinMass® LC-MS/MS Application Note MS3000, *Determination of Nicotine and -Metabolites in Urine by LC-MS/MS*, 2009, Recipe Chemicals + Instruments GmbH

Danksagung

Herzlichen Dank an Frau Dr. Alt und Herrn Dr. Ristau, Recipe, für die tatkräftige Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team der Toxikologie.