

Article original / Original article

Évaluation de la concentration de nicotine et de cotinine urinaires chez un groupe de fumeurs actifs et un groupe de « fumeurs passifs », par chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilisant une méthode d'extraction en phase solide (SPE)

Evaluation of urinary levels of nicotine and cotinine, in active and passive groups of smokers, by high performance liquid chromatography (HPLC) using a solid phase extraction method (SPE)

Amina Zouani^{1*}, Lamine Redouane Mekacher¹, Lila Lehtihet¹, Amel Iziti², Hassen Guermouche³, Mohamed Azzouz¹, Mohamed Reggabi¹

¹ Laboratoire de biologie et de toxicologie, Établissement hospitalier spécialisé Ali AitIdir, 11 boulevard Abderrezak Hahad, Alger, Algeria

² Laboratoire de toxicologie légale de la police scientifique, Château neuf, Alger, Algeria

³ Laboratoire de chromatographie, Faculté de médecine, Département de Pharmacie, Université Benyoucef Benkhedda, 18 avenue Pasteur, Alger, Algeria

Résumé – Objectifs : Évaluation de la concentration de nicotine et de cotinine urinaires et le taux de carboxyhémoglobine (HbCO) chez un groupe de fumeurs actifs ($n = 22$) et un groupe de « fumeurs passifs » ($n = 22$), afin d'apprécier l'intensité de l'imprégnation tabagique. **Matériels et méthodes :** Évaluation de la concentration de nicotine et de cotinine urinaires par chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilisant une méthode d'extraction en phase solide (SPE); évaluation du taux de la carboxyhémoglobine (HbCO) par spectrophotométrie UV-VIS. **Résultats :** Les concentrations urinaires de nicotine varient de 0,48 à 7,59 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $3,39 \pm 2,06 \mu\text{g/mL}$) chez les fumeurs actifs et de 0,31 à 1,27 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $0,64 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$) chez les « fumeurs passifs ». Les concentrations urinaires de cotinine varient de 0,99 à 9,17 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $4,14 \pm 2,35 \mu\text{g/mL}$) chez les fumeurs actifs et de 0,14 à 2,58 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $1,25 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) chez les « fumeurs passifs ». Le taux de l' HbCO varie de 0,26 à 8,02 % (moyenne : $3 \pm 0,021 \%$) chez les fumeurs actifs, les « fumeurs passifs » et les témoins présentent des taux inférieurs à la limite de détection. **Conclusion :** La nicotine et la cotinine sont plus spécifiques de l'exposition tabagique que l'HbCO. Les concentrations de nicotine et de cotinine urinaires, retrouvés chez les « fumeurs passifs », soulignent la réalité et l'intensité de l'exposition de ces derniers, d'où la nécessité de prendre des mesures plus restrictives en matière de lutte contre le tabagisme.

Mots clés : Nicotine, cotinine, carboxyhémoglobine, tabagisme

Abstract – Objectives: This paper evaluates the urinary levels of nicotine and cotinine and the level of carboxyhemoglobin (HbCO) in active ($n = 22$) and passive ($n = 22$) groups of smokers, in order to determine the severity of tobacco impregnation. **Materials and methods:** The levels of nicotine and cotinine in urine were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the solid phase extraction method (SPE); the level of carboxyhemoglobin (HbCO) was measured by UV-VIS spectrophotometry. **Results:** The results indicate that the concentration of nicotine in urine is 0.48 to 7.59 $\mu\text{g/mL}$ (average of $3.39 \pm 2.06 \mu\text{g/mL}$) in active smokers and 0.31 to 1.27 $\mu\text{g/mL}$ (average of $0.64 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$) in passive smokers. The concentration of cotinine in urine is 0.99 to 9.17 $\mu\text{g/mL}$ (average of $4.14 \pm 2.35 \mu\text{g/mL}$) in active smokers and 0.14 to 2.58 $\mu\text{g/mL}$ (average of $1.25 \pm 0.79 \mu\text{g/mL}$) in passive smokers. The level of HbCO is 0.26 to 8.02% (average of $3 \pm 0.021\%$) in active smokers and could not be detected in the passive smokers. **Conclusion:** These results demonstrate that cotinine and nicotine are more suitable for assessing the intensity

* Correspondance : Amina Zouani, zouaniamina@yahoo.fr

of tobacco exposure than HbCO. The measured levels of nicotine and cotinine in passive smokers reveal the fact that this group of people faces a high risk due to tobacco exposure; thus, restrictive measures need to be taken to protect this group.

Key words: Nicotine, cotinine, carboxyhemoglobin, tobacco

Reçu le 5 novembre 2010, accepté après modifications le 18 avril 2011

Publication en ligne le 8 juin 2011

1 Introduction

Les marqueurs du tabagisme sont utilisés pour objectiver l'exposition au tabac, ils apprécient 3 points essentiels : la dépendance au tabac, l'intensité de l'imprégnation tabagique et la façon de fumer [1].

Il est important de distinguer les marqueurs spécifiques (nicotine et cotinine) du tabac des marqueurs non spécifiques (HBCO, biomarqueurs biologiques) pouvant avoir d'autres origines que la fumée de cigarette. La nicotine est le principal alcaloïde du tabac (90 % des alcaloïdes), lors de la combustion, elle est retrouvée dans la fumée de tabac. La majeure partie est métabolisée dans le foie en plusieurs métabolites dont la cotinine (figure 1) [2]. La nicotine et ses métabolites se retrouvent dans le plasma, la salive, la sueur, les urines, le lait maternel, et même dans les cheveux, mais la plupart des investigateurs préfèrent les prélèvements urinaires que le plasma ou la salive car ils sont plus faciles à obtenir et les concentrations de nicotine et de cotinine dans les urines sont plus élevées que dans le plasma ou la salive [3].

2 Matériels et méthodes

2.1 Populations étudiées : (tableau I)

- Groupe exposé : formé d'un groupe de fumeurs chroniques (fumeurs actifs) et un groupe de « fumeurs passifs ».
- Groupe non exposé : groupe témoin (sujets sains non fumeurs, non exposés).

2.2 Prélèvements

- Nicotine et cotinine urinaires : prélèvements urinaires en fin de journée recueillis dans des poudriers stériles, bien étiquetés puis acheminés et conservés au laboratoire à -20°C jusqu'à l'analyse.
- Taux de HbCO : prélèvements sanguins sur un tube avec un anticoagulant : l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) après 5–6 h d'exposition, analysés au laboratoire dans un délai maximum d'une heure.

2.3 Techniques de dosage

2.3.1 Dosage de la nicotine et de la cotinine urinaire par HPLC

2.3.1.1 Matériel

- Appareil de chromatographie liquide haute performance WATERS à détecteur à barrette de diodes (PDA).

- Colonne Discovery HS : C18 de dimensions (250 mm \times 4,6 mm \times 5 μm).
- pH mètre (HANNA instruments).
- Cartouches d'extraction : SPE Oasis HLB de 3 mL (part No. WAT094226).

2.3.1.2 Réactifs

Acétate de sodium (Prolabo), Acide acétique pur 99–100 % (Prolabo), acétonitrile grade HPLC (Carlo Erba), méthanol grade HPLC (Sigma Aldrich), octane sulfonate de sodium (Fluka Biochemika), triéthylamine (Merck). Acétate d'ammonium, chlorure de sodium (Prolabo), hydroxyde de sodium (Fluka-chemica, solutions de calibration du pH-mètre (pH 4,01 et pH 6,89) (Schott Geräte). Solution étalon de cotinine à 1 mg/mL dans du méthanol (Sigma Aldrich), nicotine pure (Merck).

2.3.1.3 Mode opératoire

La phase mobile est constituée d'un tampon acétate (contenant 0,03 M d'acétate de sodium et 0,1 M d'acide acétique) et d'acétonitrile (78 : 22 % (v/v)) contenant 0,02 M d'octane sulfonate de sodium comme ion pair.

Le pH de la phase mobile est ajusté à 3,6 par la triéthylamine pour une meilleure résolution et pour éviter la traînée des pics chromatographiques.

Le détecteur PDA est fixé à une longueur d'onde de 259 nm et la colonne est thermostatée à 40°C . Le débit de la phase mobile est de 1 mL/min. Le volume d'injection est de 20 μL [3].

Extraction des échantillons urinaires :

- Conditionnement des SPE HLB de 3 mL : 2 mL méthanol puis 2 mL d'eau distillée.
- Préparer un mélange de 2 mL d'urines avec 2 mL de chlorure de sodium (NaCl) à 9 % à pH 13.
- Centrifuger ce mélange, récupérer le surnageant (3,8 mL) et le passer dans les SPE préconditionnées.
- Rincer les SPE avec 2 mL d'eau purifiée (deux fois).
- Éluion avec 2 mL (méthanol, acétate d'ammonium à 10 mmol/L (90/10. v/v)).

2.3.1.4 Performances de la technique

La limite de détection de la technique utilisée est de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ pour la nicotine et la cotinine. Cette méthode est linéaire de 0,1–10 $\mu\text{g/mL}$ (coefficient de corrélation = 0,999).

Tableau I. Caractéristiques des populations étudiées.

Fumeurs actifs (FA)				Fumeurs passifs (FP)				Témoins (T)		
FA	Sexe	Âge	PA*	FP	Sexe	Âge	Conditions d'exposition	T	Sexe	Âge
F1	H	41 ans	46,5	FP1	H	35 ans	Lieu de travail	T1	F	36 ans
F2	H	36 ans	20	FP2	H	40 ans	Lieu de travail	T2	F	43 ans
F3	H	44 ans	13,5	FP3	F	36 ans	Conjoint fumeur	T3	F	20 ans
F4	H	50 ans	33	FP4	H	47 ans	Lieu de travail	T4	F	40 ns
F5	H	55 ans	35	FP5	H	42 ans	Lieu de travail	T5	H	26 ans
F6	H	55 ans	13,75	FP6	F	18 ans	Père fumeur	T6	H	64 ans
F7	H	23 ans	4	FP7	F	59 ans	Conjoint fumeur	T7	H	34 ans
F8	H	31 ans	24	FP8	H	31 ans	Lieu de travail	T8	F	23 ans
F9	H	19 ans	93	FP9	H	24 ans	Père fumeur	T9	F	23 ans
F10	H	28 ans	3	FP10	F	39 ans	Lieu de travail	T10	H	38 ans
F11	H	35 ans	14,25	FP11	F	26 ans	Père fumeur	T11	H	50 ans
F12	H	28 ans	3	FP12	H	57 ans	Lieu de travail	T12	F	36 ans
F13	H	29 ans	9	FP13	H	21 ans	Lieu de travail	T13	F	39 ans
F14	H	36 ans	5,75	FP14	H	22 ans	Lieu de travail	T14	F	30 ans
F15	H	34 ans	12	FP15	F	23 ans	Lieu de travail	T15	F	29 ans
F16	H	54 ans	20	FP16	F	43 ans	Lieu de travail	T16	F	27 ans
F17	H	40 ans	17	FP17	F	38 ans	Lieu de travail	T17	H	37 ans
F18	H	32 ans	16	FP18	H	31 ans	Lieu de travail	T18	F	50 ans
F19	H	34 ans	20	FP19	H	51 ans	Lieu de travail	T19	H	45 ans
F20	H	42 ans	10	FP20	F	30 ans	Lieu de travail	T20	H	48 ans
F21	H	57 ans	30	FP21	F	53 ans	Lieu de travail	T21	F	43 ans
F22	H	36 ans	17	FP22	F	41 ans	Lieu de travail	T22	H	36 ans

PA* : Paquet-années = Nombre de paquets fumés par jour par le nombre d'années de consommation de tabac.

H : homme, F : femme.

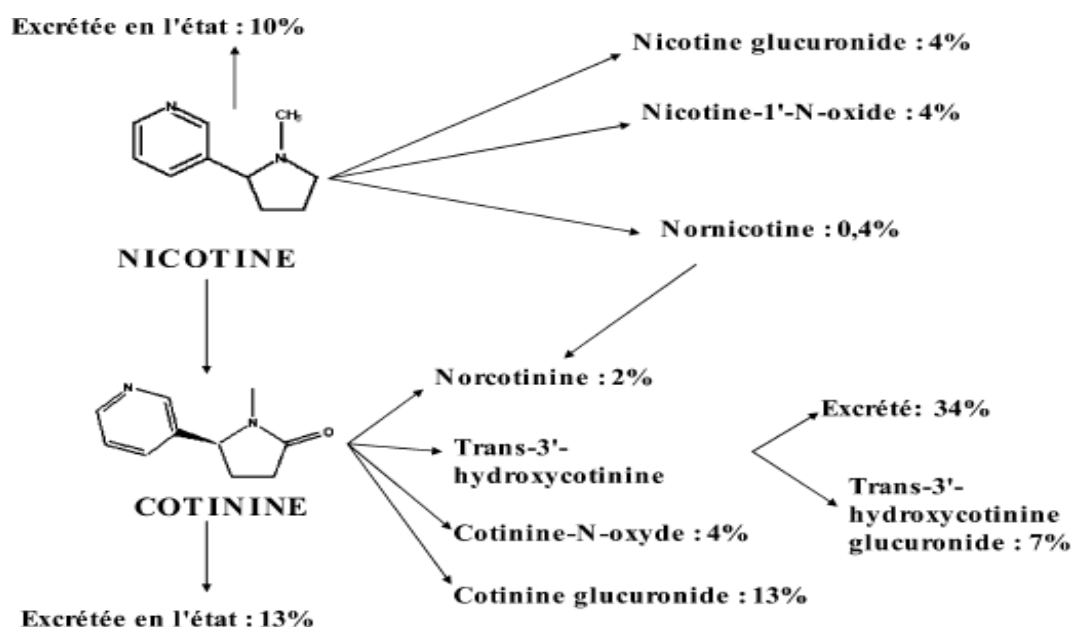


Fig. 1. Métabolisme de la nicotine [4]. Les pourcentages indiqués correspondent à la quantité relative des différents métabolites présents dans les urines.

La gamme étalon a été obtenue par la préparation de diverses concentrations : 0,5, 1, 2, 5 et 8 $\mu\text{g/mL}$ de nicotine et de cotinine, directement dans du méthanol sans extraction, à partir d'une solution mère à 20 $\mu\text{g/mL}$ de nicotine et de cotinine.

La gamme matrice a été obtenue par la préparation de diverses concentrations : 0,5, 1, 2, 5 et 8 $\mu\text{g/mL}$ de nicotine et de cotinine, directement dans des urines (ne contenant pas de cotinine ou de nicotine) à partir d'une solution mère à 20 $\mu\text{g/mL}$ de nicotine et de cotinine puis ces urines chargées vont subir une extraction dans les cartouches SPE selon la procédure décrite ci-dessus.

Le taux de recouvrement de la nicotine et de la cotinine a été mesuré sous les conditions d'extraction décrites précédemment. Il a été calculé en comparant les surfaces des pics des concentrations de la gamme matrice avec celles de la gamme étalon injectée directement sans extraction, et sans utilisation d'étalon interne. Le taux de recouvrement de la nicotine est de 83 à 93 % (moyenne : 88 %) et il est de 83 à 88 % (moyenne : 85 %) pour la cotinine.

2.3.1.5 Préparation des échantillons urinaires

Les échantillons urinaires (fumeurs actifs, « fumeurs passifs » et témoins) ont été traités selon la procédure d'extraction des échantillons urinaires décrite précédemment. Le dosage de la nicotine et de la cotinine a été effectué en rapport de la gamme matrice vu que les taux de recouvrement de la nicotine et de la cotinine sont faibles (inférieurs à 90 %).

2.3.2 Mesure du taux de carboxyhémoglobine

Il s'agit d'une méthode spectrophotométrique réalisée en milieu alcalin et basée sur un système à deux composantes : l'hémoglobine (Hb) et l'HbCO.

2.3.2.1 Matériel

- Spectrophotomètre JASCO V_570 UV_Vis_Nir.
- Cuves de lecture, section 10 mm.

2.3.2.2 Réactifs

Dithionite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) : Merck, carbonate de sodium hydraté ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) : Merck, hydroxyde de sodium (NaOH) : Fluka (Chemica), eau désionisée.

2.3.2.3 Mode opératoire

- Peser 20 mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ dissoudre et compléter dans une fiole jaugée de 25 mL avec la solution de Na_2CO_3 à 0,1 %, homogénéiser par retournement.
- Ajouter 100 μL de sang, la fiole est agitée 2 à 3 fois par retournement.
- Ajouter 2 mL de NaOH 5N, agiter 2 à 3 fois par retournement.
- Laisser reposer l'échantillon pendant 5 min.

- Lire l'absorbance par le spectrophotomètre à 532 nm et 558 nm :

$$\% \text{HbCO} = (2,44 - A_{558}/A_{532}) \times 67.$$

Où A_{558} est l'absorbance à 558 nm et A_{532} est l'absorbance à 532 nm [5].

2.3.2.4 Performances de la technique

La limite de détection de cette technique est de 0,10 %.

3 Résultats

3.1 Nicotine et cotinine

Les concentrations urinaires de nicotine varient de 0,48 à 7,59 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $3,39 \pm 2,06 \mu\text{g/mL}$) chez les fumeurs actifs et de 0,31 à 1,27 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $0,64 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$) chez les « fumeurs passifs ».

Les concentrations urinaires de cotinine varient de 0,99 à 9,17 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $4,14 \pm 2,35 \mu\text{g/mL}$) chez les fumeurs actifs et de 0,14 à 2,58 $\mu\text{g/mL}$ (moyenne : $1,25 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) chez les « fumeurs passifs ».

Les concentrations urinaires de nicotine et de cotinine sont inférieures à 0,05 $\mu\text{g/mL}$ chez les sujets.

3.2 Taux de HbCO

Le taux de HbCO varie de 0,26 à 8,02 % (moyenne : $3 \pm 0,021 \%$) chez les fumeurs actifs. Les « fumeurs passifs » et les témoins présentent des taux inférieurs à la limite de détection (0,10 %).

4 Discussion

4.1 Nicotine et cotinine urinaires

Les valeurs de nicotine et de cotinine urinaires sont significativement plus élevées chez les fumeurs actifs (nicotine : $3,39 \pm 2,06 \mu\text{g/mL}$, cotinine : $4,14 \pm 2,35 \mu\text{g/mL}$) que chez les « fumeurs passifs » (nicotine : $0,64 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$, cotinine : $1,25 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$). $p = 0,0003$ pour la nicotine et $p = 0,0007$ pour la cotinine (figures 2 et 3). Ces valeurs sont inférieures à la limite de détection chez les témoins non exposés.

50 % des fumeurs actifs affichent une concentration de nicotine supérieure à 2,41 $\mu\text{g/mL}$ dont 25 % présentent des concentrations supérieures à 4,51 $\mu\text{g/mL}$, alors que 100 % des « fumeurs passifs » présentent une concentration de nicotine inférieure à 2,41 $\mu\text{g/mL}$ (figure 4).

75 % des fumeurs affichent une concentration de cotinine supérieure à 2,74 $\mu\text{g/mL}$ dont 59 % présentent des concentrations comprises entre 2,74 et 5,34 $\mu\text{g/mL}$ et 16 % présentent des concentrations supérieures à 5,34 $\mu\text{g/mL}$, alors que 100 % des « fumeurs passifs » présentent une concentration de cotinine inférieure à 2,74 $\mu\text{g/mL}$ (figure 5).

Il n'a pas été trouvé de corrélation entre les concentrations de nicotine et de cotinine urinaires.

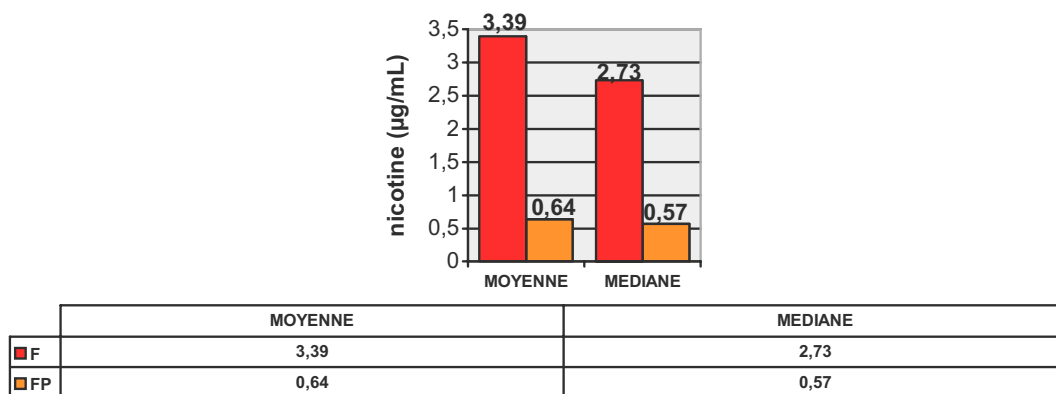


Fig. 2. (Couleur dans la version en ligne) Concentration de nicotine urinaire. Fumeurs et « fumeurs passifs ». Concentration moyennes et médianes ($\mu\text{g/mL}$).

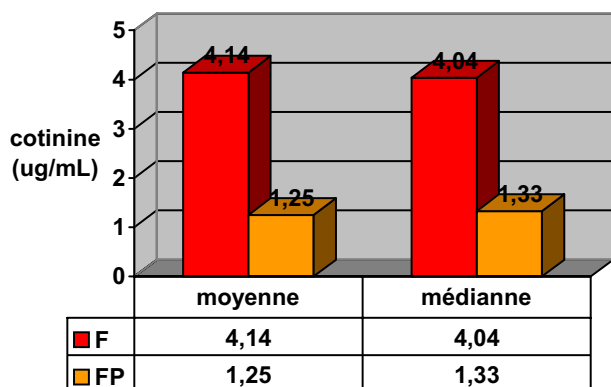


Fig. 3. (Couleur dans la version en ligne) Concentration de cotinine. Fumeurs et « fumeurs passifs ». Concentration moyennes et médianes ($\mu\text{g/mL}$).

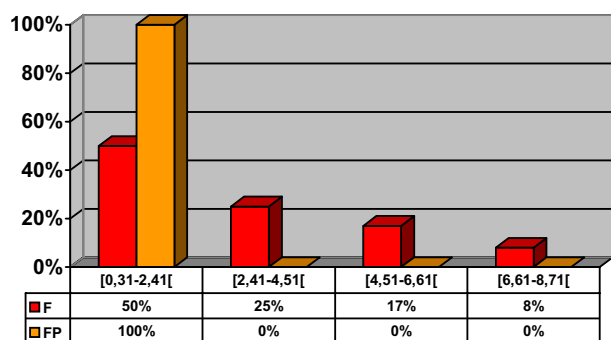


Fig. 4. (Couleur dans la version en ligne) Concentration de nicotine urinaire. Distribution des valeurs. Groupe fumeurs et « fumeurs passifs ».

Les concentrations de nicotine urinaire ne corrèlent pas l'exposition tabagique (paquet-années : PA) [coefficient de corrélation : $R = 0,25$. Pente = 0,0499].

La cotinine urinaire est corrélée positivement à l'exposition tabagique (PA) : coefficient de corrélation : $R = 0,69$ (significatif à $p < 0,02$). La cotinine est connue pour être un marqueur plus sensible et plus fidèle de l'exposition tabagique.

Notons qu'un des « fumeurs passifs » présente 2,58 $\mu\text{g/mL}$ de cotinine urinaire, ce qui correspond à une consommation de 5,7 PA (calculée par extrapolation sur la courbe : cotinine en fonction de l'exposition tabagique (PA)).

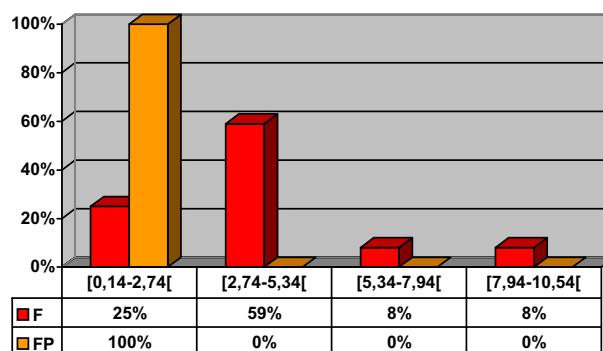


Fig. 5. (Couleur dans la version en ligne) Concentration de cotinine urinaire. Distribution des valeurs. Groupe des fumeurs et « fumeurs passifs ».

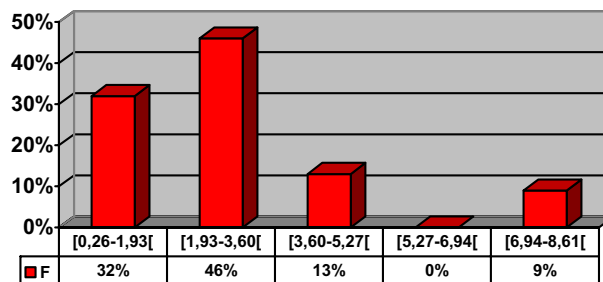


Fig. 6. (Couleur dans la version en ligne) % HbCO. Distribution des valeurs. Groupe des fumeurs.

L'exposition de ce sujet est, virtuellement, équivalente à celle d'un fumeur consommant un paquet de cigarettes depuis près de 6 ans. Ceci souligne la réalité et l'intensité de l'exposition de ces « fumeurs passifs ».

4.2 Taux d'HbCO

La moyenne d'HbCO des fumeurs (3 % \pm 0,021 %) représente le double de la valeur de référence (1,5 %). 68 % des fumeurs présentent un taux d'HbCO supérieur à la valeur de référence. 46 % des fumeurs présentent un taux d'HbCO situé entre 1,93 et 3,6 % (figure 6).

Il n'existe pas, dans le groupe de fumeurs étudié, de corrélation entre l'exposition tabagique (PA) et le taux d'HbCO. En effet, l'HbCO est un marqueur peu spécifique et qui ne corrèle pas l'exposition tabagique.

5 Conclusion

La nicotine et la cotinine sont plus spécifiques de l'exposition tabagique que l'HbCO. Leurs concentrations urinaires sont, très significativement, plus élevées chez les fumeurs que chez les « fumeurs passifs », ils sont indétectables chez les témoins.

La cotinine, présentant une longue demi-vie (15 h) et moins de variabilité interindividuelles que la nicotine, constitue un marqueur sensible et fidèle de l'exposition tabagique.

Les concentrations de nicotine et de cotinine urinaires, retrouvées chez les « fumeurs passifs », soulignent la réalité et l'intensité de l'exposition de ces « fumeurs passifs », d'où la nécessité de prendre des mesures plus restrictives en matière de lutte contre le tabagisme.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

1. Gourlin H, Galliot-Guilley M. Quels sont les marqueurs du tabagisme ? *Journal de gynécologie obstétrique et biologie reproductive*. 2005; 34 (1): 154-155.
2. Hadj Mohamed D. Dosage de cotinine urinaire : intérêt pour l'évaluation du statut tabagique. Tunis : Mémoire on line 2007; 1-2.
3. Gokni VV, Kulkarni PK, Prikh JR, Siyed HN. Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid – phase extraction and liquid chromatography. *J chromatogr B*. 2004; 802: 323-328.
4. Lefèvre P. Alcaloïdes du tabac. In : *Comprendre la dépendance pour agir*. INSERM. Kremlin-Bicêtre, 2005; 34-35.
5. Katsumata Y, Aoki M, Sato K, Suzuki O, Yada S. A simple spectrophotometry for determination of carboxyhemoglobin in blood. *J Forensic Sci*. 1982; 27(4): 1-3.