



## **DETERMINATION OF NICOTINE, COTININE AND CAFFEINE IN STANDARD AND ALTERNATIVE BIOLOGICAL MATERIAL – USEFULNESS IN CLINICAL AND FORENSIC TOXICOLOGY**

Marek WIERGOWSKI<sup>1</sup>, Livia NOWAK-BANASIK<sup>2</sup>, Zbigniew JANKOWSKI<sup>1</sup>, Anna MORKOWSKA<sup>1</sup>,  
Jacek SEIN ANAND<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Gdańsk, Poland*

<sup>2</sup> *Department and Clinic of Internal Diseases of Geriatrics and Clinical Toxicology, Medical Academy, Gdańsk, Poland*

### **Abstract**

The aim of the work was to develop a reliable procedure for determining nicotine, cotinine and also caffeine in standard biological materials (blood, urine) and also alternative ones (saliva). An attempt was made to assess the usefulness of these determinations in forensic and clinical toxicology. Selection of biological material for chemo-toxicological study should be made depending on the aim of the study. The optimum material for study of current concentration of nicotine, cotinine and caffeine in the organism of a living person is saliva, which will most probably replace blood. For analysis of the latter requires use of an invasive method of collection, which is linked to risk. Distinguishing between active and passive smokers is possible on the basis of comparison of cotinine concentrations in urine; this distinction can then be confirmed by determining content of nicotine and cotinine in hair. Cotinine seems to be the optimum biomarker of smoking, fulfilling requirements of specificity and determinability with a relatively broad time range (window) of detectability. In the case of assessment of consumption of products rich in caffeine, it is sufficient to study its unmetabolised form. For differentiation between passive and active smokers, liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC/UV-DAD) can be used.

### **Key words**

Nicotine; Cotinine; Biomarkers of smoking tobacco; Traditional and alternative biological materials; Chemo-toxicological analysis; Caffeine.

*Received 30 October 2006; accepted 27 December 2006*

### **1. Introduction**

Nicotine and caffeine are currently amongst the most frequently used legal stimulants. In the course of smoking tobacco, over 4000 chemical compounds are formed, of which about 40 possess carcinogenic properties. It is generally known that smoking tobacco is one of the main and modifiable risk factors for diseases of the circulatory system, respiratory system and tumours (cancer). In the year 2000 alone, the number of deaths related to tobacco smoking exceeded approx.

4.2 million persons in the world. In Poland, consumption of tobacco products is amongst the highest in Europe; almost 10 million Poles remain active tobacco smokers [24, 29, 34, 37]. However, products containing caffeine, including coffee, are consumed by over 80% of people in the world. Caffeine possesses weaker psychoactive activity than nicotine [2, 13].

A relatively frequent result of chemo-toxicological analyses in studied biological samples is detection of nicotine, caffeine and also their metabolites, which is

linked to the universality of drinking coffee and smoking cigarettes.

The aim of the work was to establish a reliable procedure for determining nicotine and its metabolite – cotinine and also caffeine in standard (blood, urine) and also alternative biological materials (hair, saliva). An attempt was also made to assess the usefulness of these determinations in forensic and clinical toxicology, especially objective biomarkers of tobacco smoking, and on the basis of their concentrations to ascertain whether it is possible to distinguish between active and passive tobacco smokers. This may have a practical application in medico-legal judicature – especially relating to insurance, and also in clinical treatment.

## 2. Properties and metabolism of nicotine and caffeine in the human organism

Processes that are an effect of smoking tobacco and also consumption of products rich in caffeine are linked to each other on the metabolic level in the human organism. Smoking stimulates cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) – the main enzyme responsible for metabolism of caffeine. A consequence of this process is the fact that smokers of tobacco have a significantly greater need for products containing caffeine in relation to non-smokers. In connection with this after consumption of the same dose of caffeine its concentration in blood plasma in tobacco smokers is four times lower than in non-smokers [19]. Nicotine also interacts with caffeine and alcohol, and also intensifies the action of NSAIDs. Simultaneous long-term exposure to caffeine and nicotine contributes to the development of arterial hypertension and also atherosclerosis, increasing the risk of occurrence of myocardial infarction and also stroke [12, 15, 16, 20].

### 2.1. Nicotine

Nicotine is absorbed into the blood via the mucous membrane of the oral cavity, the skin and also the alveolo-capillary barrier in the lungs [38]. The fastest uptake of nicotine occurs in the respiratory system, where the pH in the pulmonary alveolus is about 7.4. The absorption of this compound through the skin is used above all in nicotine substitution therapy; absorption via the digestive tract, on the other hand, is low due to the acidity of gastric juice. Figure 1 presents metabolic transformations of nicotine.

Metabolites of nicotine and also remaining unmetabolised nicotine eventually become coupled with

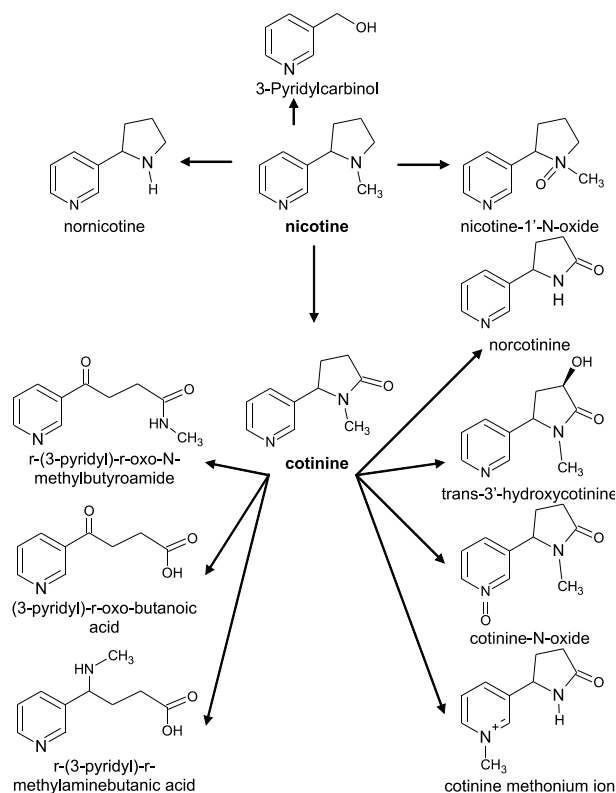


Fig. 1. Metabolic pathway of nicotine [8].

glucuronic acid and are excreted *via* the urine. The intensity of the above transformations depends on age, sex and race [27]. Above 70% of nicotine in the organism is transformed to cotinine and other metabolic products, and is then excreted in urine [4, 7, 11, 21].

Nicotine has an inducing influence on the activity of many enzymes of the microsomal fraction of cells (CYP2E1, CYP2B2, CYP1A1 and CYP1A2), which are responsible, amongst other things, for metabolism of other xenobiotics. Also, enzymes taking part in phase II of the biotransformation of medicines (e.g. glucuronyltransferase) can be activated by multi-ring aromatic hydrocarbons that are formed during smoking of cigarettes. Carbon monoxide contained in tobacco smoke and also heavy metals may exhibit an inhibiting effect on a range of enzymes metabolising various xenobiotics, including, above all, medicines.

Activation of CYP1A2 causes e.g. a decrease in the effect of the action of chlorpromazine, chlordiazepoxide, clorazepate, fluvoxamine, oxazepam, clozapine and olanzapine and also an increase in the clearance of caffeine even by 60%. Smoking of tobacco also forces an increase in administration by about 50% of pentazocine used in treatment of morphine and heroin dependence [33].

## 2.2. Caffeine

Caffeine is a natural alkaloid with weak psychoactive action. Coffee grains contain about 1–2% caffeine, whilst tea leaves about 1–4% caffeine [2]. Caffeine is absorbed completely and quickly from the digestive tract, and its maximum concentration in blood occurs after about 1 h [1, 18]. It passes easily both across the blood-brain barrier and the placental barrier, and its distribution in the organism is proportional to the degree of hydration of tissues. Caffeine does not accumulate. Its biological half-life is 2.5–4.5 h. Moderate consumption of caffeine rarely constitutes a threat to human health. The toxic dose is approx. 0.5–1 g, which is equivalent to a caffeine concentration in blood of approx. 15 000 ng/ml; the lethal dose is estimated to be about 10 g, which corresponds to a concentration in the blood of about 115 000 ng/ml of caffeine. Symptoms of acute poisoning are: fear, irritation, rage, photophobia, headaches, dilation of pupils, arousal, vomiting, disturbances of heart rhythm, stimulation of the respiratory centre, insomnia, and even hallucination. Long term abuse of caffeine may lead to chronic poisoning, which manifests in excessive psychomotor arousal (racing thoughts), arterial hypertension, anxiety, insomnia and increased diuresis. It has been shown that daily taking of caffeine may result in development of physical tolerance of the organism [16, 23].

It may turn out that caffeine has numerous interactions with medicines. It seems that this substance may intensify the action of non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drugs (e.g. interaction of caffeine with acetylsalicylic acid leads to hyperadditive synergy). A similar chemical structure and a similar mechanism of action of theophiline, aminophiline and caffeine often lead to interaction of these compounds in persons with bronchial asthma or chronic inflammation of the bronchi.

## 3. Biomarkers

### 3.1. General comments

In medicine, characteristic symptoms for a given disease or behaviour e.g. drinking alcohol or smoking cigarettes etc have been sought for a long time. As laboratory diagnosis has improved over the years, characteristic substances have been sought whose occurrence or increase in concentration in blood would be specific for a given disease or behaviour. Such substances are termed biomarkers (markers). A biomarker should be characterised by specificity in relation to a studied

property, a long half-life and also the possibility of simple and reliable qualitative and quantitative determination in body fluids. In the case of persons consuming products containing caffeine – due to the relatively high toxic dose – there is no need to study metabolites besides caffeine itself. However, the situation is different for persons smoking tobacco. During smoking a very great number of chemical compounds are generated, which can interfere both with the biomarker itself and other substances originating from the surroundings of the studied person. In toxicological analysis, such biomarkers as nicotine, cotinine, carboxyhemoglobin and also the thiocyanate ion [8] are used most frequently in order to differentiate active smokers of tobacco from non-smokers. Recently attempts have also been made with other biomarkers of exposure to tobacco smoke, including: 1-hydroxypyrene [39], adducts of DNA and proteins [3] or 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) [10].

### 3.2. Nicotine

The half-life of nicotine in serum is about 2 h. For this reason – in spite of the fact that it is a highly specific substance for tobacco smoking – it does not fulfil requirements of a good biomarker, especially when there is long-term exposure to tobacco smoking.

### 3.3. Cotinine

Cotinine – the main metabolite of nicotine – has a half-life of approx. 16–48 h and that is why it is acknowledged as a specific marker of exposure to tobacco smoke [9]. Cotinine is metabolised to cotinine glucuronide, 3-hydroxy-cotinine and also 3-hydroxy-cotinine glucuronide. This fact means that concentrations of cotinine determined in serum or urine may turn out to be much lower in relation to the accepted dose of nicotine [8]. Mean concentrations of cotinine not exceeding 10 ng/ml in saliva and serum and also 50 ng/ml in urine are characteristic of passive exposure to tobacco smoke, whilst in active tobacco smokers these concentrations are significantly higher, amounting to approx. 350–500 ng/ml in blood and 1700 ng/ml in saliva (Table I) [5, 8, 9, 21, 25, 26, 27, 29, 30, 38].

### 3.4. Carboxyhemoglobin and thiocyanate ion

Carboxyhemoglobin (COHb) is rarely used as a marker of exposure to passive smoking, mainly due to its short half-life (3–4 h) and its non-specificity for tobacco smoking.

TABLE I. REFERENCE CONCENTRATIONS OF NICOTINE AND COTININE IN BIOLOGICAL MATERIAL AND STATE OF SMOKING AND EXPOSURE TO PASSIVE SMOKING [5, 8, 9, 21, 25, 26, 27, 29, 30, 38]

	Non-smoking		Active smoking	
	Not exposed to passive smoking	Exposed to passive smoking	1–10 Cigarettes daily	>10 Cigarettes daily
Concentration of nicotine [ng/ml, for hair – ng/mg]				
Blood	–*	3–60	3–60	950–1200
Saliva	–	3–60	3–60	950–1200
Urine	–	–	–	–
Hair	–	1.2	–	20–240
Concentration of cotinine [ng/ml, for hair – ng/mg]				
Blood	–	10	80	300–500
Saliva	–	10	70	300–500
Urine	6.2	10–50	650	1100–1700
Hair	–	0.3	–	6–20

\* No data available.

The thiocyanate ion enables differentiation between smokers and non-smokers; however, consumption of food rich in this ion (e.g. potatoes, tomatoes) causes limitation of its application for this purpose [8].

#### 4. Selection of biological material

##### 4.1. General comments

Selection of biological material for chemo-toxicological analysis should be made on the basis of the aim of the analysis. Assessment of exposure to tobacco smoke or active smoking that has taken place in the last few hours can be based on determination of nicotine and its metabolites in blood or saliva. A longer period, up to three days, can be established after analysing urine, whilst the longest – even up to several months – after analysis of hair and (or) nails. Biological material collected for study should be stored in closed glass or polypropylene vessels at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.2. Blood

After collecting at least 5 ml of blood and placing into a vessel with anticoagulant, blood should be centrifuged (2000 g) for about 10 min and stored in a frozen state. Analysis of blood provides information about the current concentration of analytes, and results of analysis are easy to compare with reference values.

The usefulness of blood as an analytical material is limited by the invasiveness of collection and the lack of possibility of retrospective assessment of concentrations of studied compounds. Results of study of biomarkers in blood have a limited ability to differentiate between passive smokers and sporadic or moderately active smokers. Concentrations of cotinine of approx. 10 ng/ml can occur both in smokers of about 1–10 cigarettes daily and in passive smokers.

##### 4.3. Saliva

Concentrations of analytes in saliva are usually proportional to their concentration in blood. The advantage of this material is the possibility of multiple non-invasive collection without risk of e.g. infection, and collection does not require professional medical personnel and is not a “violation of privacy”. One of the methods of collecting a large amount of saliva is to advise subjects, after rinsing out their mouth with water, not to swallow saliva for about 5 min. In this way it is possible to obtain about 5 ml of saliva, which should then be centrifuged and frozen at a temperature of  $20^{\circ}\text{C}$  until time of analysis. In order to increase production of saliva, substances which increase its secretion (e.g. citric acid) can also be used [8]. The disadvantage of analysing saliva is a lack of standardisation of methods of collection and also physico-chemical analysis, which makes it difficult to compare and interpret results.

#### 4.4. Urine

Urine constitutes a “concentrated” solution of various chemical compounds, which facilitates chemotoxicological analysis. Drawbacks of this material include the possibility of easy falsification of sample, and the necessity of monitoring during collection can be treated as a “violation of privacy” and “intimacy”. Cotinine content in urine should be expressed as the ratio of cotinine concentration to creatinine concentration with the aim of taking into account degree of concentration or dilution of urine. In studies carried out by the authors of this paper, it has been observed that amongst active smokers the concentration of cotinine was significantly higher in urine in relation to its content in blood serum and saliva [36].

#### 4.5. Hair

Determination of nicotine and cotinine in hair can be helpful in differentiating between passive and active smokers (Table I). An advantage of this method of analysis is the possibility of detecting a substance even when there was sporadic use up to several months earlier (on average hair grows about 1 cm per month), the simple non-invasive method of collection, lack of possibility of falsifying sample and also the fact that hair does not require special conditions of storage up to the time of analysis, and its collection is not associated with risk of transmitting infectious diseases. In studies performed by the authors of this paper, we did not succeed in collecting hair either due to a lack of “abundant hair”, or for aesthetic reasons [32]. The usefulness of chemo-toxicological analysis of hair is limited by a lack of uniform and repeatable methods of extraction and final determination. Chemo-toxicological analysis does not enable detection of analytes taken a short time before (the analysis).

### 5. Methods of determination

The choice of analytical technique used to determine concentration of analytes usually depends on the following factors: the values of their concentrations most frequently occurring in studied samples, the method of preparation for final analysis, the composition of the matrix (other compounds that are not the subject of analysis), available apparatus and also financial possibilities of the laboratory.

Immunochemical tests are used for preliminary detection (so-called screening) of cotinine, nicotine and also caffeine. The most frequently used screening tests

are based on the immunoenzymatic ELISA (enzyme-linked immunoassay) method and also the radioimmunoassay (radioimmunoassay) method [17, 28]. High specificity of antibodies used in immunochemical methods allows quick elimination of samples not containing the analyte.

Concentrations of cotinine and nicotine in urine were also determined with the help of a direct colorimetric test with barbituric acid, and the results of analyses were comparable with results obtained by HPLC [31, 35]. Currently most reliable and specific methods of determining cotinine, nicotine and caffeine are chromatographic techniques, in which qualitative and quantitative determination is carried out using mass spectrometry (HPLC-MS, GC-MS) [8, 10].

### 6. Own studies

#### 6.1. Material

Biological material for analyses was obtained with the help of the Clinic of Internal Diseases and Acute Poisonings of the Medical Academy in Gdansk). After receiving permission from the Independent Bioethical Commission for Scientific Research at the AMG (nr NKEBN/516/2005), samples of blood, urine and saliva were collected from 24 persons after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA). Due to lack of abundant hair or for aesthetic reasons, hair was not collected from subjects. Furthermore, 4 persons refused collection of any sort of biological material. In material taken 1 to 6 months after the PTCA, concentrations of nicotine, cotinine and caffeine were analysed with the aim of objectively checking whether patients, in accordance with recommendations of medical doctors, had stopped smoking cigarettes. In the studied group there were 18 men aged 48 to 76, and also 6 women ranging from 56 to 70 years old.

#### 6.2. Method of analyses

The method of determination of cotinine, nicotine and caffeine in serum, urine and saliva was prepared and modified on the basis of a procedure developed by Zuccaro and also Głowacki et al. [14, 40]. The analytical parameters of the developed method and also a description of the questionnaire survey have been described in detail in earlier publications [6, 36].

### 6.3. Discussion of results

Preliminary results determined for 20 subjects after PTCA, giving content of nicotine, cotinine and caffeine are presented in Table II, III and IV.

The small group of studied persons and also doubts concerning the veracity of submitted declarations concerning smoking of tobacco (especially persons declaring exposure to passive smoking and also non-smokers) mean that average results cannot be compared with reference data. Hence, particular persons and content of nicotine and cotinine in body fluids determined for them were compared with concentrations gained from literature on the subject, and contained in Table I. Amongst 7 persons declaring themselves as persons actively smoking cigarettes, average concentrations of cotinine and nicotine in saliva were higher than in blood, and highest – in the case of nicotine – in urine. On the basis of performed chemo-toxicological analyses and questionnaire surveys, it was ascertained that as many as 42% of subjects after PTCA were active tobacco smokers, but as many as 30% of smokers covered up this fact during the medical examination. Differentiating between active smokers and those exposed to passive smoking was possible on the basis of comparing concentrations of cotinine in urine; however, it should be remembered

that distinguishing persons smoking up to several cigarettes per day from persons exposed to passive smoking can be very difficult. In such a case, it would be more reliable to determine cotinine and nicotine in hair. Clear differences between particular average values for caffeine content in smokers, those exposed to passive smoking and non-smokers were not observed (Table IV).

For the needs of forensic toxicology, it seems more useful to determine the concentration of cotinine, nicotine and caffeine in traditional materials. Results of analyses in blood and urine are reliable and universally recognised. Analyses of alternative materials are still treated as supplementary. Hair seems to be a valuable material in forensic toxicology, which may be used in cases of long-term exposure to the action of tobacco smoke. Hair is considered to be a so-called excretory tissue, in which studied analytes accumulate, which, taking into account the long time of slow growth of hair gives possibilities of detecting analytes even many years after the moment of their incorporation into the structure of the hair [25].

From the point of view of clinical toxicology, determination in alternative materials turns out to be especially valuable. Concentrations of cotinine, nicotine and also caffeine in saliva are comparable to their content in blood serum. Determinations obtained on the

TABLE II. CONCENTRATIONS OF NICOTINE IN BLOOD SERUM, SALIVA AND URINE IN PERSONS DECLARING THEMSELVES TO BE SMOKERS ( $n = 7$ ), EXPOSED TO PASSIVE SMOKING ( $n = 4$ ) AND ALSO NON-SMOKERS ( $n = 9$ )

Studied material	Number of persons	Average concentration	Range of concentrations
Concentration of nicotine [ng/ml] in persons declaring themselves to be smokers			
Blood	7 (2)*	50	50
Saliva	7 (3)*	510	110–740
Urine	7 (3)*	3500 (1100)**	560–9500 (170–2800)**
Concentration of nicotine [ng/ml] in persons declaring themselves exposed to passive smoking			
Blood	4 (1)*	79	79
Saliva	4 (1)*	380	380
Urine	4 (2)*	245 (280)**	220–270 (270–290)**
Concentration of nicotine [ng/ml] in persons declaring themselves to be non-smokers			
Blood	9 (1)*	29	29
Saliva	9 (2)*	380	80–680
Urine	9 (3)*	980 (1200)**	13–2300 (18–2600)**

\* – Number of persons with positive results given in brackets; \*\* – values of concentrations expressed relative to creatinine content are presented in brackets [ng/mg]\*\*.

TABLE III. CONCENTRATIONS OF COTININE IN BLOOD SERUM, SALIVA AND URINE IN PERSONS DECLARING THEMSELVES AS: SMOKERS ( $n = 7$ ), EXPOSED TO PASSIVE SMOKING ( $n = 4$ ) AND ALSO NON-SMOKERS ( $n = 9$ )

Studied material	Number of persons	Average concentration	Range of concentrations
Concentration of cotinine [ng/ml] in persons declaring themselves as smokers			
Blood	7 (5)*	190	23–360
Saliva	7 (3)*	560	190–1100
Urine	7 (4)*	600 (280)**	140–1020 (40–470)**
Concentration of cotinine [ng/ml] in persons declaring themselves to be exposed to passive smoking			
Blood	4 (3)*	310	24–590
Saliva	4 (1)*	320	320
Urine	4 (3)*	540 (640)**	40–1100 (240–1100)**
Concentration of cotinine [ng/ml] in persons declaring themselves as non-smokers			
Blood	9 (3)*	68	18–150
Saliva	9 (3)*	110	27–190
Urine	9 (3)*	290 (350)**	45–760 (62–860)**

\* – Number of persons with positive results given in brackets; \*\* – values of concentrations expressed relative to creatinine content are presented in brackets\*\* [ng/mg].

TABLE IV. CONCENTRATIONS OF CAFFEINE IN BLOOD SERUM, SALIVA AND URINE [ng/ml] IN PERSONS DECLARING THEMSELVES AS: SMOKERS ( $n = 7$ ), EXPOSED TO PASSIVE SMOKING ( $n = 4$ ) AND NON-SMOKERS ( $n = 9$ )

Studied Material	Number of persons	Average concentration	Range of concentrations
Concentration of caffeine [ng/ml] in persons declaring themselves to be smokers			
Blood	7 (7)*	540	130–1700
Saliva	7 (3)*	2200	330–3300
Urine	7 (5)*	1300 (770)**	330–2500 (160–2200)**
Concentration of caffeine [ng/ml] in persons declaring themselves to be exposed to passive smoking			
Blood	4 (4)	4700	890–8800
Saliva	4 (3)	3800	550–8300
Urine	4 (4)	3400 (3800)	320–6500 (150–8600)**
Concentration of caffeine [ng/ml] in persons declaring themselves to be non-smokers			
Blood	9 (9)*	370	18–1100
Saliva	9 (5)*	870	12–2600
Urine	9 (6)*	580 (700)**	190–1090 (150–1200)**

\* – Number of persons with positive results given in brackets; \*\* – values of concentrations expressed relative to creatinine content are presented in brackets\*\* [ng/mg].

basis of analysis of hair allow us to differentiate active smokers from non-smokers who are exposed to tobacco smoke, i.e. passive smokers. It has been estab-

lished that the concentration of nicotine and cotinine in hair is correlated with the duration and intensity of the tobacco smoking habit [21].

## 7. Summary

1. On the basis of questionnaire surveys and also results of chemo-toxicological analyses of biological material taken from 20 persons, it was ascertained that active tobacco smokers made up as many as 42% of subjects after PTCA, whilst as many as 30% of smokers covered up this fact during the medical examination.
2. A reliable assessment of tobacco smoking may be carried out on the basis of determination of cotinine concentration in blood serum, saliva and urine using liquid chromatography with spectrophotometric detection (HPLC/UV-DAD). In the studies, it was ascertained that cotinine occurs at similar concentrations in serum and in saliva. Data contained in the literature on the subject also confirm such a result for content of cotinine. They give a basis for substituting saliva analysis for blood analysis in the near future.
3. Distinguishing between active smokers and persons exposed to passive smoking is possible on the basis of comparing values of concentrations of cotinine in urine; confirmation of such differentiation can be obtained by determining content of nicotine and cotinine in hair, which unfortunately was not possible in the performed studies due to lack of abundant hair or for aesthetic reasons.
4. Cotinine seems to be the optimum biomarker of smoking, which fulfils requirements of specificity and determinability in a relatively wide time range (window) of detection. In the case of assessment of consumption of products rich in caffeine it is sufficient to study its unmetabolised form.

## References

1. Arnaud M. J., Garattini S., Metabolism of caffeine. Caffeine, coffee and health, Raven Press, New York 1993.
2. Ashihava H., Crozier A., Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science, *Trend in Plant Science* 2001, 9, 407.
3. Baer-Dubowska W., Addukty DNA i białek – markery ekspozycji na dym tytoniowy i ryzyka schorzeń degeneracyjnych, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 932–935.
4. Benowitz N. L., The role of nicotine in smoking – related cardiovascular disease, *Preventive Medicine* 1997, 26, 412–417.
5. Bogdanik T., Toksykologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1988.
6. Chodorowski Z., Nowak-Banasik L., Wierowski M. [i in.], Ocena narażenia na czynne i bierne palenie tytoniu wśród chorych po zabiegach przezskórnej angioplastyki wieńcowej (PTCA) za pomocą oznaczenia poziomu kotyniny w surowicy, moczu i ślinie. Doniesienie wstępne, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 914–915.
7. Deniz Yildiz D., Nicotine and its metabolism and an overview of its biological effects, *Toxicol* 2004, 48, 619.
8. 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* 2004, 35, 155–168.
9. Dziuda M., Grzybowski A., Kotynina – biomarker ekspozycji na dym tytoniowy, *Przegląd Lekarski* 1999, 56, 2.
10. Florek E., Piekoszowski W., Lechowicz W. [i in.], Oznaczenie 4-(metylonitrozoamino)-4-(3-pirydylo)-1-butanolu (NNAL) w moczu kobiet ciężarnych metodą LC/MS/MS, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 926–931.
11. Freeman D. J., Griffin B. A., Murray E., Smoking and plasma lipoproteins in man: Effects on low-density lipoprotein cholesterol levels and high-density lipoprotein subfraction distribution, *Journal of the American College of Cardiology* 1993, 23, 630–640.
12. Gilbert R. M., Caffeine as a drug of abuse, *Research advances in alcohol and drug problems* 1999, 3, 49–77.
13. Gilbert R. M., Spiller G. A., The methylxanthine beverages: chemistry, consumption and health effects, Liss, New York 1984.
14. Głowacki R., Brózik H., Sabanty W. [i in.], A simultaneous measurement of nicotine and cotinine in the urine of smokers and passive smokers by high-performance liquid chromatography, *Chemia Analityczna* 2000, 45, 205.
15. Jarosz M., Dzieniszewski J., Interakcje leków z żywnością i alkoholem, Borgis, Warszawa 2004.
16. Judelson D. A., Armstrong L. E., Roti M. W. [et al.], Effect of chronic caffeine intake on choice reaction time, mood and visual vigilance, *Physiology & Behavior* 2005, 85, 629–934.
17. Knight G. J., Palomaki G. E., Lea D. H. [et al.], Exposure to environmental tobacco smoke measured by cotinine 125 I – radioimmunoassay, *Clinical Chemistry* 1989, 35, 1036–1039.
18. Kostowski W., Herman Z. S., Podstawy farmakoterapii, PZWL, Warszawa 2003.
19. Leona J., Diaza F. J., Rogers T. [et al.], A pilot study of plasma caffeine concentrations in a US sample of smoker and nonsmoker volunteers, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 2003, 27, 165–171.
20. Mezzafera P., Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee, *Phytochemistry* 2001, 30, 3913–3916.
21. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Clarke's analysis of drugs and poisons, PhP Pharmaceutical Press, London 2004.
22. Nakahara Y., Hair analysis for abused and therapeutic drugs, *Journal of Chromatography B* 1999, 733, 161–180.



23. Nehling A., Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1999, 23, 563–576.
24. Nikogosian H., Petrea I., Mauer-Stander K., WHO European Country Profiles on Tobacco Control 2003, WHO Regional Office for Europe, Kobenhavn 2003.
25. Pichini S., Altieri I., Pellergini M. [et al.], Hair analysis for nicotine and cotinine: evaluation of extraction procedures, hair treatments and development of reference material, *Forensic Science International* 1997, 84, 243.
26. Pichini S., Altieri I., Pellergini M. [et al.], The analysis of nicotine in infants' hair for measuring exposure to environmental tobacco smoke, *Forensic Science International* 1997, 84, 253.
27. Pirkle J.L., Flegal K.M., Bernert J.T. [et al.], Exposure of the U.S. population to environmental tobacco smoke: the third national health and nutrition examination survey, 1988 to 1991, *Journal of American Medical Association* 1996, 275, 1233.
28. Preston A. M., Ramos L.J., Calderon C. [et al.], Exposure of Puerto Rican children to tobacco smoke, *Preventive Medicine* 1997, 26, 1–7.
29. Przewoźniak K., Trendy palenia tytoniu w Polsce w latach 1974–1994, Instytut Medycyny Pracy, Lublin 1995.
30. Riesselman B., Rosenbaum F., Roscher S. [et al.], Fatal caffeine intoxication, *Forensic Science International* 1999, 103, 49.
31. Rustemeier K., Demetriou D., Schepers G., Vonker P. J.: High-performance liquid chromatographic determination of nicotine and its urinary metabolites via their 1,3-dihydro-2-thiobarbituric acid derivatives, *Journal of Chromatography B* 1993, 613, 95–103.
32. Sabanty W., Brózik H., Wybrane wskaźniki stanu zdrowia oraz stężenie kotyniny w moczu chłopców z łódzkich szkół podstawowych narażonych na działanie dymu tytoniowego w środowisku domowym, *Przegląd Pedagogiczny* 2004, 34, 52.
33. Seńczuk W. [red.], Toksykologia współczesna, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2005.
34. Szukalski B., Narkotyki. Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, IPiN, Warszawa 2005.
35. Tyrpień K., Wielkoszyński T., Janoszka B., Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites, *Journal of Chromatography A*, 2000, 870, 29–32.
36. Wiergowski M., Nowak-Banasik L., Morkowska A. [i in.], Problematyka oznaczania nikotyny i kotyniny w ludzkim materiale biologicznym w aspekcie badań toksykologicznych, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 892–896.
37. Zatoński W., Przewoźniak K., Zdrowotne następstwa palenia tytoniu w Polsce, Ariel, Warszawa 1992.
38. Zevin S., Gourlay S. G., Benowitz N. L., Clinical pharmacology of nicotine, *Clinics in Dermatology* 1998, 16, 557–564.
39. Zielińska-Danch W., Wardas W., Sobczak A., Ocena przydatności 1-hydroksypirenu, karboksyhemoglobiny i kotyniny jako biomarkerów narażenia na dym tytoniowy, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 922–925.
40. Zuccaro P., Altieri I., Rosa M. [et al.], Solid-phase extraction of nicotine and its metabolites for high-performance liquid chromatographic determination in urine, *Journal of Chromatography B* 1995, 668, 187.

---

**Corresponding author**

Marek Wiergowski  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Akademii Medycznej w Gdańsku  
ul. Dębowa 23  
80-204 Gdańsk  
e-mail: marwier@amg.gda.pl

---

## OZNACZANIE NIKOTYNY, KOTYNYNY I KOFEINY W KLASYCZNYM I ALTERNATYWNYM MATERIALE BIOLOGICZNYM – PRZYDATNOŚĆ W TOKSYKOLOGII KLINICZNEJ I SĄDOWEJ

### 1. Wstęp

Do najczęściej obecnie stosowanych legalnych używek należy nikotyna oraz kofeina. W trakcie palenia tytoniu dochodzi do powstania ponad 4000 związków chemicznych, z czego około 40 posiada właściwości kancerogenne. Powszechnie wiadomo, że palenie tytoniu jest jednym z głównych i modyfikowalnych czynników ryzyka chorób układu krążenia, układu oddechowego oraz nowotworów. Tylko w 2000 r. liczba zgonów wykazujących związek z paleniem tytoniu przekroczyła ok. 4,2 mln osób na całym świecie. W Polsce konsumpcja wyrobów tytoniowych należy do najwyższych w Europie, zaś aktywnymi palaczami tytoniu pozostaje niemal 10 mln Polaków [24, 29, 34, 37]. Natomiast produkty zawierające kofeinę, w tym kawę, spożywa ponad 80% ludzi na całym świecie. Kofeina posiada słabsze niż nikotyna działanie psychoaktywne [2, 13].

Stosunkowo częstym wynikiem analiz chemiczno-toksykologicznych w badanych próbkach biologicznych jest wykrywanie nikotyny, kofeiny oraz ich metabolitów, co wiąże się z powszechnością picia kawy i palenia papierosów.

Celem pracy było ustalenie miarodajnej procedury oznaczania nikotyny i jej metabolitu kotyniny oraz kofeiny w klasycznych (krew, mocz) oraz alternatywnych (włosy, ślina) materiałach biologicznych. Podjęto również próbę oceny przydatności tych oznaczeń w toksykologii sądowej i klinicznej, w szczególności obiektywnych biomarkerów palenia tytoniu, a na podstawie ich stężeń określono możliwość odróżnienia aktywnych i biernych palaczy tytoniu. Może to mieć praktyczne zastosowanie w orzecznictwie sądowo-lekarskim, zwłaszcza ubezpieczeniowym, oraz w leczeniu klinicznym.

### 2. Właściwości i metabolizm nikotyny i kofeiny w organizmie człowieka

Procesy będące efektem palenia tytoniu oraz konsumpcji produktów bogatych w kofeinę są w organizmie człowieka powiązane ze sobą na poziomie metabolicznym. Palenie pobudza cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) główny enzym odpowiedzialny za metabolizm kofeiny. Konsekwencją tego procesu jest fakt, że palacze tytoniu mają znacząco większe zapotrzebowanie na produkty zawierające kofeinę w stosunku do osób niepalących. W związku z tym po spożyciu takiej samej dawki kofeiny

jej stężenie w osoczu krwi u palacza tytoniu jest czterokrotnie mniejsze niż u osób niepalących [19]. Nikotyna wchodzi także w interakcje z kofeiną, alkoholem, a także nasila działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Jednoczesna długotrwała ekspozycja na kofeinę i nikotynę przyczynia się do rozwoju nadciśnienia tętniczego oraz miażdżycy, zwiększając ryzyko wystąpienia zawału serca oraz udaru mózgu [12, 15, 16, 20].

#### 2.1. Nikotyna

Nikotyna wchłania się do krwi przez błonę śluzową jamy ustnej, skórę oraz barierę pęcherzykowo-włośniczkową w płucach [38]. Najszybszy wychwyt nikotyny zachodzi w układzie oddechowym, gdzie pH w pęcherzykach płucnych wynosi ok. 7,4. Zdolność wchłaniania tego związku przez skórę jest wykorzystywana przede wszystkim w trakcie prowadzenia nikotynowej terapii zastępczej, zaś wchłanianie z przewodu pokarmowego jest niewielkie z powodu kwaśnego odczynu soku żołądkowego. Przemiany metaboliczne nikotyny przedstawia rycina 1.

Metabolity nikotyny oraz pozostała niezmetabolizowana nikotyna ostatecznie ulegają sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym i wydalane są z moczem. Intensywność powyższej przemiany zależy od wieku, płci i rasy [27]. Ponad 70% nikotyny w organizmie jest przekształcane do kotyniny i innych produktów metabolicznych, a następnie wydalane z moczem [4, 7, 11, 21].

Nikotyna posiada indukujący wpływ na aktywność wielu enzymów frakcji mikrosomalnej komórek (CYP2E1, CYP2B2, CYP1A1 i CYP1A2), które są odpowiedzialne m.in. za metabolizm innych ksenobiotyków. Także enzymy biorące udział w II fazie biotransformacji leków (np. glukuronylotransferaza) mogą być aktywowane przez wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne powstające w czasie palenia papierosów. Zawarty w dymie tytoniowym tlenek węgla oraz metale ciężkie mogą wykazywać hamujący wpływ na szereg enzymów metabolizujących różne ksenobiotyki, w tym przede wszystkim leki.

Aktywacja CYP1A2 powoduje np. zmniejszenie efektu działania chloropromazyny, chlordiazepoksydu, klorzepatu, fluwoksaminy, oksazepamu, klozapiny i olanzapiny oraz wzrost klirensu kofeiny nawet o 60%. Palenie tytoniu zmusza także do zwiększenia o ok. 50% stosowanej w leczeniu zależności morfinowej i heroinowej pentazocyny [33].

## 2.2. Kofeina

Kofeina jest naturalnym alkaloidem o słabym działaniu psychoaktywnym. Ziarna kawy zawierają ok. 1–2%, zaś liście herbaty ok. 1–4% kofeiny [2]. Kofeina wchłania się całkowicie i szybko z przewodu pokarmowego, a jej maksymalne stężenie we krwi występuje po ok. 1 h [1, 18]. Przechodzi ona łatwo zarówno przez barierę krew-mózg, jak i barierę łożyskową, a jej rozmieszczenie w organizmie jest proporcjonalne do stopnia uwodnienia tkanek. Kofeina nie ulega kumulacji. Jej biologiczny okres półtrwania wynosi 2,5–4,5 h. Umiarkowane spożycie kofeiny rzadko stanowi zagrożenie dla zdrowia człowieka. Dawka toksyczna wynosi ok. 0,5–1 g, co jest równoważne stężeniu kofeiny we krwi wynoszącym ok. 15 000 ng/ml, zaś dawka śmiertelna szacowana jest na ok. 10 g, co odpowiada stężeniu we krwi ok. 115 000 ng/ml kofeiny. Objawy ostrego zatrucia to: lęk, rozdrażnienie, złość, światłowstręt, bóle głowy, rozszerzenie źrenic, pobudzenie, wymioty, zaburzenia rytmu serca, pobudzenie ośrodkowego układu oddechowego, bezsenność, a nawet halucynacje. Długotrwałe nadużywanie kofeiny może prowadzić do przewlekłego zatrucia, które objawia się nadmiernym pobudzeniem psychoruchowym (tzw. gonitwa myśli), podwyższeniem ciśnienia tętniczego krwi, niepokojem, bezsennością oraz zwiększoną diurezą. Wykazano, że codzienne przyjmowanie kofeiny może skutkować rozwojem fizycznej tolerancji organizmu [16, 23].

Kolejnym działaniem kofeiny mogą okazać się liczne interakcje lekowe. Wydaje się, że substancja ta może nasilać działanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych (np. interakcja kofeiny z kwasem acetylosalicylowym prowadzi do synergizmu hiperaddycyjnego). Podobna budowa chemiczna oraz podobny mechanizm działania teofiliny, aminofiliny i kofeiny doprowadzają często do interakcji tych związków u osób z astmą oskrzelową lub przewlekłym zapaleniem oskrzeli.

## 3. Biomarkery

### 3.1. Uwagi ogólne

W medycynie od dawna poszukiwano objawów charakterystycznych dla danej choroby bądź zachowania, np. picia alkoholu, palenia papierosów itp. W miarę postępu diagnostyki laboratoryjnej od lat poszukuje się charakterystycznych substancji, których pojawienie się lub wzrost stężenia we krwi byłyby swoiste dla danej jednostki chorobowej lub zachowania. Substancje takie noszą nazwę biomarkerów (markerów). Biomarker powinien charakteryzować się swoistością w relacji do badanej właściwości, długim czasem połowicznego zaniku oraz możliwością prostego i miarodajnego oznaczenia

jakościowego i ilościowego w płynach ustrojowych. W przypadku osób spożywających produkty zawierające kofeinę z uwagi na relatywnie dużą dawkę toksyczną nie ma potrzeby badania jej metabolitów poza samą kofeiną. Inaczej dzieje się jednak u osób palących tytoń. Podczas palenia dochodzi do generowania bardzo dużej liczby związków chemicznych, które mogą interferować zarówno z samym biomarkerem, jak również innymi substancjami pochodzącymi z otoczenia badanej osoby. W analizie toksykologicznej w celu zróżnicowania aktywnych palaczy tytoniu od osób niepalących stosuje się najczęściej takie biomarkery, jak nikotyna, kotynina, karboksyhemoglobina oraz jon tiocyjanianowy [8]. Ostatnio podejmowane są również próby z innymi biomarkerami narażenia na dym tytoniowy, do których należą: 1-hydroksypiren [39], addukty DNA i białek [3] czy 4-(metylonitroamino)-4-(3-pirydylo)-1-butanol (NNAL) [10].

### 3.2. Nikotyna

Okres półtrwania nikotyny w surowicy wynosi ok. 2 h. Z tego powodu mimo że jest to substancja wysoce swoista dla palenia tytoniu nie spełnia wymogów dobrego biomarkera, zwłaszcza przy długotrwałym narażeniu na palenie tytoniu.

### 3.3. Kotynina

Kotynina – główny metabolit nikotyny – ma okres półtrwania wynoszący ok. 16–48 h i dlatego jest ona uznana za specyficzny marker ekspozycji na dym tytoniowy [9]. Kotynina metabolizuje do glukuronidu kotyniny, 3-hydroksy-kotyniny oraz glukuronidu 3-hydroksykotyniny. Fakt ten powoduje, że stężenia kotyniny oznaczone w surowicy lub moczu mogą okazać się dużo niższe w stosunku do przyjętej dawki nikotyny [8]. Średnie stężenia kotyniny nieprzekraczające 10 ng/ml w ślinie i surowicy oraz 50 ng/ml w moczu są charakterystyczne dla biernej ekspozycji na dym tytoniowy, zaś u aktywnych palaczy tytoniu stężenia te są znacznie wyższe i wynoszą we krwi ok. 350–500 ng/ml oraz w ślinie 1700 ng/ml (tabela I) [5, 8, 9, 21, 25, 26, 27, 29, 30, 38].

### 3.4. Karboksyhemoglobina i jon tiocyjanianowy

Karboksyhemoglobina (COHb) jest rzadko stosowana jako marker narażenia na bierne palenie, głównie z powodu krótkiego czasu połowicznego zaniku (3–4 h) oraz jej nieswoistości dla palenia tytoniu.

Jon tiocyjanianowy pozwala na zróżnicowanie palaczy i osób niepalących, jednakże spożywanie żywności bogatej w ten jon (np. ziemniaki, pomidory) powoduje ograniczenie jego zastosowania w tym celu [8].

## 4. Wybór materiał biologicznego

### 4.1. Uwagi ogólne

Wybór materiału biologicznego do badania chemiczno-toksykologicznego powinien być dokonany na podstawie założonego celu analizy. Ocenę narażenia na dym tytoniowy lub czynne palenie, które miało miejsce w ciągu kilku ostatnich godzin, można oprzeć na oznaczeniu nikotyny i jej metabolitów dokonanym we krwi lub ślinie. Dłuższy okres, do trzech dni, możliwy będzie do ustalenia po badaniu moczu, zaś najdłuższy nawet do kilku miesięcy – po analizie włosów i (lub) paznokci. Materiał biologiczny pobierany do badań powinien być przechowywany w szklanych lub polipropylenowych zamkniętych naczyniach w temperaturze 20°C.

### 4.2. Krew

Po pobraniu co najmniej 5 ml krwi do naczynia z antykoagulantem krew powinna być odwirowana (2000 g) przez ok. 10 min i przechowywana w stanie zamrożonym. Analiza krwi dostarcza informacji o aktualnym stężeniu analitów, a wyniki pomiarów łatwo jest porównać z wartościami referencyjnymi. Przydatność krwi jako materiału analitycznego ograniczają inwazyjny sposób pobierania oraz brak możliwości retrospektywnej oceny stężeń badanych związków. Wyniki badania biomarkerów we krwi ograniczają odróżnianie palaczy biernych od czynnych palących sporadycznie lub umiarkowanie. Stężenia kotyniny wynoszące ok. 10 ng/ml mogą wystąpić zarówno u osób palących ok. 10 papierosów dziennie, jak również u palaczy biernych.

### 4.3. Ślina

Stężenia analitów w ślinie są zwykle proporcjonalne do ich stężenia we krwi. Zaletą tego materiału jest możliwość wielokrotnego nieinwazyjnego jego otrzymania bez ryzyka np. infekcji, a pobranie nie wymaga udziału fachowego personelu medycznego i nie jest „pogwałceniem prywatności”. Jednym ze sposobów pobrania większej ilości śliny jest zalecenie, aby po przepłukaniu wodą jamy ustnej badany nie połykał śliny przez okres ok. 5 min. W ten sposób możliwe jest uzyskanie ok. 5 ml śliny, którą następnie należy odwirować i zamrozić w temperaturze 20°C do czasu analizy. W celu zwiększenia produkcji śliny można zastosować także substancje zwiększające jej wydzielanie (np. kwas cytrynowy) [8]. Wadą badania śliny jest brak standaryzacji metod jej pobierania oraz analizy fizykochemicznej, co utrudnia porównywanie i interpretację wyników.

### 4.4. Mocz

Mocz stanowi „zagęszczony” roztwór różnych związków chemicznych, co ułatwia analizę chemiczno-toksykologiczną. Do wad tego materiału zalicza się możliwość łatwego zafałszowania próbki, a konieczność kontroli podczas jego pobierania może być traktowana jako „pogwałcenie prywatności” i „intymności”. Zawartość kotyniny w moczu powinno wyrażać się stosunkiem stężenia kotyniny do stężenia kreatyniny w celu uwzględnienia stopnia zagęszczenia lub rozcieńczenia moczu. W przeprowadzonych przez autorów tej pracy badaniach zaobserwowano, że wśród aktywnych palaczy stężenie kotyniny było znacząco wyższe w moczu w stosunku do jej zawartości w surowicy krwi i ślinie [36].

### 4.5. Włosy

Pomocne w odróżnieniu palaczy biernych od czynnych może być także oznaczenia nikotyny i kotyniny we włosach (tabela I). Zaletą tego sposobu badania jest możliwość wykrycia substancji nawet przy sporadycznym jej używaniu do kilku miesięcy wstecz (średnio włosy rosną ok. 1 cm na miesiąc), prosty nieinwazyjny sposób pobierania, brak możliwości zafałszowania próbki oraz fakt, że włosy nie wymagają specjalnych warunków przechowywania do czasu analizy, a przy ich pobieraniu nie ma ryzyka przeniesienia chorób zakaźnych. W prowadzonych przez autorów tej pracy badaniach nie udało się pobrać włosów bądź z powodu braku obfitego owłosienia, bądź ze względów natury estetycznej [32]. Przydatność badania chemiczno-toksykologicznego włosów ogranicza brak jednolitych i powtarzalnych metod ekstrakcji i oznaczenia końcowego, co jest przyczyną uwiarygodnienia i prawidłowej interpretacji wyników. Analiza chemiczno-toksykologiczna włosów nie daje możliwości wykrycia analitów przyjmowanych na krótki czas przed badaniem.

## 5. Metody oznaczania

Wybór techniki analitycznej stosowanej do oznaczenia stężenia analitów zależy zwykle od następujących czynników: wartości ich stężeń najczęściej występujących w badanych próbkach, sposobu przygotowania do analizy końcowej, składu matrycy (inne związki, niebędące przedmiotem analizy), dostępnej aparatury oraz możliwości finansowych laboratorium.

Do wstępnego wykrycia (tzw. skryningu) kotyniny, nikotyny oraz kofeiny służą testy immunochemiczne. Najczęściej stosowane testy przesiewowe opierają się na metodzie immunoenzymatycznej ELISA (ang. enzyme-linked immunoassay) oraz radioimmunologicznej RIA (ang. radioimmunoassay) [17, 28]. Duża swoistość przeciwciał używanych w metodach immunochemicznych

pozwała na szybkie wyeliminowanie próbek, które nie zawierają analitu.

Stężenia kotyniny i nikotyny w moczu oznaczano również za pomocą bezpośredniego testu kolorymetrycznego z kwasem barbiturowym, a wyniki analiz były porównywalne z wynikami otrzymanymi metodą chromatografii cieczowej HPLC [31, 35]. Obecnie większość miarodajnych i swoistych metod oznaczania kotyniny, nikotyny i kofeiny to techniki chromatograficzne, w których oznaczenie jakościowe i ilościowe jest wykonywane przez wykorzystanie spektrometrii mas (HPLC-MS, GC-MS) [8, 10].

## 6. Badania własne

### 6.1. Materiał

Materiał biologiczny do badań uzyskano przy współpracy z Kliniką Chorób Wewnętrznych i Ostrego Zatrucia Akademii Medycznej w Gdańsku. Po uzyskaniu zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań Naukowych przy AMG (nr NKEBN/516/2005) 24 osób po zabiegach przezskórnej angioplastyki wieńcowej (PTCA) pobrano próbki krwi, moczu i śliny. Z powodu braku obfitego owłosienia lub względów natury estetycznej nie pobrano od probantów włosów. Ponadto 4 osoby odmówiły pobrania jakiegokolwiek materiału biologicznego. W materiale pobranym po upływie od 1 do 6 miesięcy od czasu zabiegu badano stężenia nikotyny, kotyniny i kofeiny w celu obiektywnego sprawdzenia, czy pacjenci, stosując się do zaleceń lekarzy, przestali palić papierosy. W badanej grupie było 18 mężczyzn w wieku od 48 do 76 lat oraz 6 kobiet w wieku od 56 do 70 lat.

### 6.2. Metoda badań

Metodykę oznaczenia kotyniny, nikotyny i kofeiny w surowicy krwi, moczu i ślinie przygotowano i zmodyfikowano na podstawie procedury opracowanej przez Zuccaro oraz Głowackiego i in. [14, 40]. Parametry analityczne opracowanej metody oraz opis badania ankietowego podano szczegółowo we wcześniejszych publikacjach [6, 36].

### 6.3. Omówienie wyników

Wstępne wyniki oznaczone dla 20 probantów po zabiegu PTCA oceniające zawartość nikotyny, kotyniny i kofeiny przedstawiono w tabeli II, III i IV.

Mała grupa badanych osób oraz wątpliwości dotyczące prawdziwości złożonych deklaracji dotyczących palenia tytoniu (zwłaszcza osób deklarujących narażenie na bierne palenie oraz osób niepalących) sprawia, że nie można średnich wyników porównywać z danymi referen-

cyjnymi. Stąd poszczególne osoby i oznaczone dla nich zawartości nikotyny i kotyniny w płynach ustrojowych porównywano ze stężeniami zaczerpniętymi z literatury przedmiotu, a zawartymi w tabeli I. Wśród 7 osób deklarujących się jako osoby aktywnie palące papierosy, średnie stężenia kotyniny i nikotyny w ślinie były wyższe niż we krwi, a w moczu w przypadku nikotyny najwyższe. Na podstawie przeprowadzonych badań chemiczno-toksykologicznych oraz badań ankietowych stwierdzono, że czynnymi palaczami tytoniu było aż 42% probantów po przebyciu zabiegu PTCA, natomiast aż 30% palaczy zataiło ten fakt podczas badania lekarskiego. Rozróżnienie palaczy czynnych od narażonych na palenie bierne było możliwe na podstawie porównywania stężeń kotyniny w moczu, jednak należy pamiętać, że odróżnienie osób palących do kilku papierosów dziennie oraz osób narażonych na palenie bierne może być bardzo trudne. W takim przypadku bardziej wiarygodne byłoby oznaczenie kotyniny i nikotyny we włosach.

Nie zaobserwowano wyraźnych różnic między poszczególnymi wartościami średnimi pomiędzy zawartością kofeiny u osób palących, narażonych na bierne palenie i niepalących (tabela IV).

Dla potrzeb toksykologii sądowej bardziej użyteczne wydają się oznaczenia stężeń kotyniny, nikotyny i kofeiny w materiałach klasycznych. Wyniki analiz we krwi i moczu są wiarygodne i powszechnie uznawane. Analizy materiałów alternatywnych traktowane są nadal jako uzupełniające. Cennym materiałem w toksykologii sądowej wydają się włosy, które można wykorzystać w przypadkach długotrwałego narażenia na działanie dymu tytoniowego. Włosy zaliczane są do tzw. tkanek wydaliniczych, w których badane anality ulegają kumulacji, co przy uwzględnieniu długiego czasu powolnego wzrostu włosów daje możliwości wykrywania analitów nawet po wielu latach od momentu ich wbudowania w strukturę włosa [25].

Z punktu widzenia toksykologii klinicznej szczególnie wartościowe okazują się oznaczenia w materiałach alternatywnych. Stężenia kotyniny, nikotyny oraz kofeiny w ślinie są porównywalne do ich zawartości w surowicy krwi. Oznaczenia uzyskane na podstawie badania włosów pozwalają na odróżnienie palaczy czynnych od osób niepalących, lecz narażonych na działanie dymu tytoniowego, czyli tzw. palaczy biernych. Ustalono, że stężenia nikotyny i kotyniny we włosach korelują z czasem trwania oraz intensywnością nałogu palenia tytoniu [21].

## 7. Podsumowanie

1. Na podstawie badań ankietowych oraz wyników badań chemiczno-toksykologicznych materiału biologicznego pobranego od 20 osób stwierdzono, że czynnymi palaczami tytoniu było aż 42% probantów po

- przebyłym zabiegu PTCA, natomiast aż 30% palaczy zataiło ten fakt podczas badania lekarskiego.
2. Miarodajna ocena palenia tytoniu może być dokonana na podstawie oznaczenia stężenia kotyniny w surowicy krwi, ślinie i moczu za pomocą chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną HPLC/UV-DAD. W badaniach stwierdzono, że kotynina występuje w zbliżonych stężeniach w surowicy krwi i w ślinie. Taki wynik zawartości kotyniny potwierdzają także dane zawarte w literaturze przedmiotu. Dają one podstawę do zastąpienia w niedalekiej przyszłości badanie krwi analizą śliny.
  3. Odróżnienie czynnych palaczy i osób narażonych na bierne palenie jest możliwe na podstawie porównania wartości stężeń kotyniny w moczu, jednak uwiarygodnienie takiego zróżnicowania można uzyskać po oznaczeniu zawartości nikotyny i kotyniny we włosach, co niestety nie było możliwe w wykonanych badaniach z powodu braku obfitego owłosienia lub względów natury estetycznej.
  4. Kotynina wydaje się optymalnym biomarkerem palenia, który spełnia wymagania swoistości i oznaczalności w relatywnie szerokim zakresie „okna” czasowego detekcji. W przypadku oceny spożycia produktów bogatych w kofeinę wystarczające jest badanie jej niezmetabolizowanej formy.