



Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Menggunakan Kolom Oktil Silika *Fully Endcapped Residual Silanol* pada Pemisahan Kotinin dan 3-Hidroksikotinin dalam Sampel Urin

(Optimized Method of High Performance Liquid Chromatography using Octyl Silica Fully Endcapped Residual Silanol Column on Separation of Cotinine and 3-Hydroxycotinine in Urine Sample)

CHRISTINE PATRAMURTI^{1,2*}, SUDIBYO MARTONO³, SUGIYANTO⁴,
ARIEF NURROCHMAD⁴

¹Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jakarta 12640.

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta 55281.

³Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.

Diterima 20 Maret 2012, Disetujui 29 September 2013

Abstrak: Kotinin (COT) dan 3-hidroksikotinin (3-HCOT) merupakan metabolit nikotin yang dikeluarkan melalui urin. Perubahan nikotin menjadi COT dan 3-HCOT diperantarai oleh enzim sitokrom P450 2A6 (CYP 2A6). Aktivitas enzim ini dapat diprediksi dari nilai rasio kadar 3-HCOT terhadap COT. Oleh karena itu nilai rasio 3-HCOT terhadap COT banyak digunakan pada studi fenotipe dan polimorfisme enzim tersebut. Pada penelitian ini, isolasi COT dan 3-HCOT dari sampel urin dilakukan dengan teknik isolasi cair-cair secara bertingkat. Analisis simultan COT dan 3-HCOT dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik menggunakan kolom oktil silika (C8; Shimadzu 250×4,6 mm, 5µm) *fully endcapped residual silanol*. Larutan standar internal (SI) yang digunakan adalah asetanilid. Sistem fase gerak yang dapat memisahkan COT, 3-HCOT dan SI adalah campuran metanol : amonium asetat 5mM (50:50) pada kecepatan alir 0,8 mL/menit. Nilai waktu retensi (t_r) ketiga senyawa kurang dari 10 menit, dengan nilai *peak tailing factor* (t_p) kurang dari 2. Nilai resolusi (R_s) 3-HCOT terhadap COT adalah 2,67, sedangkan nilai R_s COT terhadap SI adalah 8,84.

Kata kunci: Kotinin, 3-hidroksikotinin, pemisahan, kolom oktil silika, KCKT.

Abstract: Cotinine (COT) and 3-hydroxycotinine (3-HCOT) are nicotine metabolite excreted in urine. Mediated by the enzyme cytochrome P450 2A6 (CYP 2A6), nicotine will be metabolized to COT and 3-HCOT. The activity of CYP 2A6 can be predicted from the ratio 3-HCOT to the COT, therefore the ratio of 3-HCOT and COT can be used as phenotyping and polymorphism studies of the enzyme. In this study, isolation COT and 3-HCOT of urine samples was carried out by liquid-liquid back extraction. Simultaneous analysis of COT and 3-HCOT using High Performance liquid Chromatography (HPLC) was performed by a reversed-phase octyl silica column (C8; Shimadzu 250 × 4.6 mm, 5 µm) fully endcapped residual silanol. The internal standard solution (SI) was acetanilide. The mobile phase which separate COT, 3-HCOT and SI was methanol : ammonium acetate 5 mM (50:50) at a flow rate 0.8 mL/min. Retention time (t_r) of the three compounds was less than 10 minutes, with peak tailing factor (t_p) was less than 2. The resolution (R_s) 3-HCOT to COT was 2.67, while the R_s COT to SI was 8.836.

Keywords: cotinine, 3-hydroxycotinine, separation, octyl silica column, HPLC.

* Penulis korespondensi, Hp. 085729800913
e-mail: patra@usd.ac.id



PENDAHULUAN

KOTININ (COT) dan 3-hidroksikotin (3-HCOT) merupakan dua senyawa metabolit utama yang dihasilkan dari metabolisme nikotin oleh enzim sitokrom P450 2A6 (CYP2A6). Sejumlah 70 hingga 80% dosis nikotin akan dimetabolisme oleh sitokrom P450 2A6 (CYP2A6) menjadi COT melalui mekanisme C-oksidasi⁽¹⁾. COT oleh enzim tersebut selanjutnya akan dioksidasi menjadi 3- atau 7-hidroksikotin. Kedua metabolit ini larut dalam air dan dikeluarkan melalui urin⁽²⁾. COT dan 3-HCOT mempunyai waktu paro eliminasi masing-masing adalah 20 jam dan 15 jam. Kadar COT dalam urin berkisar antara 1-10 mg/L, sedangkan kadar 3-HCOT dalam urin bisa mencapai 3-4 kali dari kadar COT⁽³⁾.

Penetapan kadar kedua senyawa ini telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti. Hal ini disebabkan nilai rasio dari kadar 3-HCOT/COT dapat digunakan untuk menentukan aktivitas enzim CYP2A6⁽⁴⁾. CYP2A6 merupakan salah satu golongan enzim CYP yang mempunyai bentuk polimorfi, oleh karena itu perbedaan nilai aktivitas enzim yang dilihat dari nilai 3-HCOT/COT dapat digunakan sebagai parameter penentu penotipe enzim CYP2A6⁽⁵⁾. Tingkat metabolisme nikotin dalam tubuh tiap individu dapat berbeda satu dengan yang lain. Enzim CYP2A6 banyak ditemukan di hati, seseorang yang memiliki kelainan pada enzim ini, organ hatinya menjadi kurang efektif dalam memetabolisme nikotin. Polimorfisme genetik CYP2A6 memegang peranan penting pada proses metabolisme nikotin⁽⁶⁾. Bentuk polimorfi gen CYP2A6 ini merupakan faktor utama yang mempengaruhi farmakokinetik nikotin⁽⁷⁾.

Berbagai macam penetapan kadar kedua senyawa ini dalam cairan biologis, baik dalam plasma, serum maupun urin telah banyak dikembangkan. Berbagai teknik isolasi COT dan 3-HCOT dalam urin telah banyak dikembangkan, baik menggunakan ekstraksi padat-cair maupun ekstraksi cair-cair⁽⁸⁻¹⁰⁾. Pada penelitian ini, isolasi COT dan 3-HCOT dilakukan dengan teknik ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut campuran kloroform : etanol (9:1).

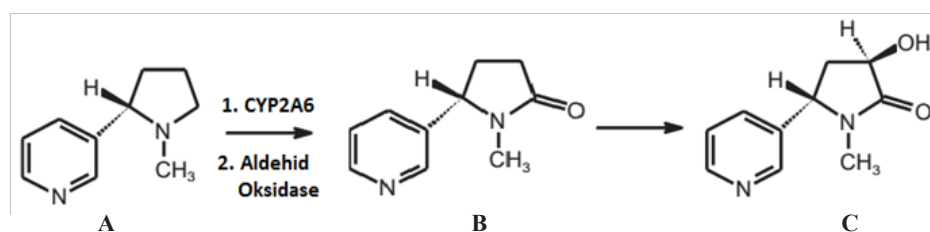
Metode analisis yang paling banyak digunakan adalah kromatografi gas dan kromatografi gas yang

dikopel dengan spektrometer massa⁽¹¹⁻¹⁴⁾. Selain metode GC, metode KCKT fase terbalik dengan kolom oktadesilsilan (C18) sebagai fase diam juga merupakan salah satu metode yang banyak dikembangkan untuk kepentingan analisis rutin kedua senyawa ini. Detektor yang digunakan dapat berupa detektor UV^(15,16) dan spektrometer massa^(2,17-20).

Pada metode KCKT fase terbalik, fase diam yang digunakan selain kolom C18 juga dapat dilakukan dengan kolom C8. Penggunaan fase diam kolom C8 pada metode KCKT untuk analisis COT, nikotin dan kafein pernah dilakukan oleh Page-Sharp⁽²¹⁾. Ketiga senyawa yang dianalisis ini bersifat basa, oleh karena itu pada penelitiannya, Page-Sharp menggunakan trietilamin dalam fase gerak untuk mengurangi interaksi yang terjadi antara ketiga analit dengan residu silanol yang terdapat pada fase diam. Menurut Snyder⁽²²⁾ terjadinya interaksi antara analit yang bersifat basa dengan residu silanol pada fase diam dapat juga diatasi dengan menggunakan kolom C8 *fully endcapped residual silanol*. Pada penelitian ini, selain COT, senyawa lain yang akan dianalisis adalah 3-HCOT, senyawa ini juga merupakan senyawa yang bersifat basa. Optimasi metode KCKT pada pemisahan 3-HCOT dan COT menggunakan kolom C8 *fully endcapped residual silanol* perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi sistem KCKT yang dapat memisahkan kedua analit dengan bentuk puncak kromatogram yang baik, sehingga respon kedua analit tidak saling mengganggu dan selanjutnya dapat digunakan untuk analisis dalam sampel biologis. Pada penelitian ini, sistem yang dikembangkan dapat menghasilkan kromatogram dengan *tailing factor* <2 serta dapat memisahkan kedua senyawa dengan baik, dengan nilai $R_s > 1,5$. Dua senyawa yang dianalisis dapat keluar dari kolom dengan waktu yang singkat, kurang dari 10 menit; sehingga metode yang dikembangkan ini dapat digunakan untuk analisis rutin dari kedua senyawa dalam sampel urin.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Senyawa baku kotinin (Sigma Chemical Co., St. Louis), senyawa baku 3-hidroksikotin (Santa Cruz Biotechnology Inc.), asetanilid dan amonium



Gambar 1. Metabolisme nikotin (A) menjadi COT (B) dan 3-HCOT (C) oleh enzim CYP2A6.⁽²⁾

asetat (E Merck), metanol (KCKT grade) (E Merck), kalium hidroksida, kloroform dan etanol (reagent grade) (J. T. Baker Chemical), aquabidest.

METODE. KCKT Shimadzu LC 2010HT yang dilengkapi detektor UV-Vis seri SPD-20A/20AV serta seperangkat komputer merk Dell B6RDZ1S *Connexant System* RD01-D850. Analisis dilakukan menggunakan kolom Premier C8 (Shimadzu 250×4,6 mm, 5µm *fully endcapped residual silanol*) pada suhu kamar dengan dektektor UV pada 260 nm. Optimasi pemisahan analit dilakukan dengan berbagai komposisi fase gerak yang terdiri dari campuran metanol : asam asetat 5 mM. Perbandingan komposisi metanol : asam asetat 5mM yang dioptimasi adalah 9:1; 7:3; 6:4 dan 5:5. Selain perbandingan komposisi fase gerak, parameter yang dioptimasi adalah kecepatan alir fase gerak, yaitu pada 0,5; 0,8; dan 1,0 mL/menit. Volume injeksi larutan analit adalah 20 µL.

Penyiapan Larutan Baku dan Standard Internal (SI) Asetanilid. Larutan persediaan baku COT, 3-HCOT, dan SI 1 mg/mL dibuat dengan pelarut metanol 30%. Larutan ini disimpan pada suhu 4°C. Larutan baku kerja dibuat dengan mengencerkan larutan baku persediaan menggunakan pelarut metanol 30%. Adapun kadar larutan baku kerja 3-HCOT adalah 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 µg/mL; sedangkan kadar larutan baku kerja COT adalah 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 dan 10,0 µg/mL. Kadar larutan SI yang digunakan adalah 1 µg/mL. Masing-masing larutan yang sudah dibuat, disaring menggunakan *millipore* dan diawadarkan menggunakan ultrasonikator selama 15 menit. Larutan ini siap untuk diinjeksikan pada sistem KCKT.

Optimasi Pemisahan COT dan 3-HCOT Menggunakan KCKT Fase Terbalik dengan Kolom C8. Sejumlah 20,0 µL masing-masing larutan baku yang telah disiapkan di atas, diinjeksikan pada sistem KCKT dengan komposisi fase gerak yang akan dioptimasi. Kromatogram yang dihasilkan diamati bentuk *peak*-nya dengan melihat nilai *tailing factor*-nya (t_f) serta nilai R_s antara dua senyawa yang saling berdekatan dari ketiga analit yang dianalisis serta waktu retensinya (t_R). Kondisi sistem KCKT dikatakan optimum jika kromatogram yang dihasilkan mempunyai nilai $t_f < 2$; $R_s > 1,5$ serta t_R kurang dari 10 menit⁽²²⁾.

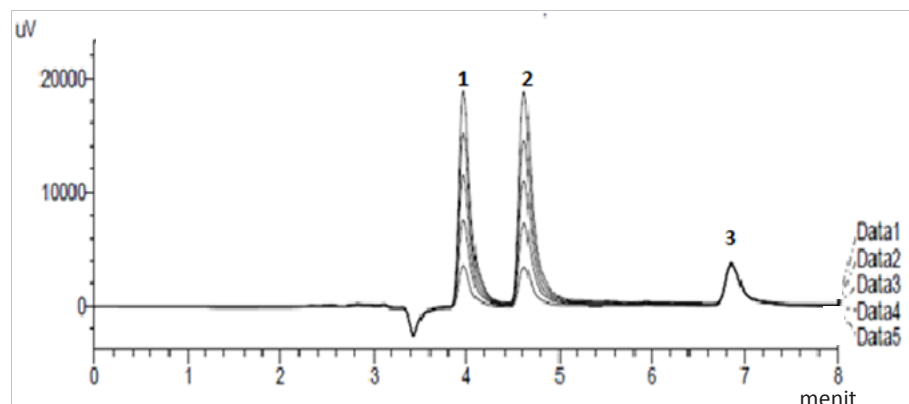
Preparasi Sampel Urin. Sampel urin diambil dari subjek uji dengan status bukan perokok (untuk blanko) dan perokok (1 hari merokok 10 batang rokok). Dua minggu sebelum penelitian, subjek uji tidak boleh minum obat apapun atau minum minuman beralkohol. Sebelum dilakukan pengambilan urin, subjek uji dipuaskan selama 8 sampai 10 jam. Pengambilan urin dilakukan pada pagi hari dari urin pertama yang dikeluarkan oleh subjek uji. Sampel

urin ini disimpan pada suhu -20 °C sebelum dianalisis. Sejumlah 1,0 mL urin sampel ditambahkan 1 µg/mL larutan SI, kemudian diekstraksi dengan pelarut kloroform/etanol (9:1, v/v) sebanyak 5 kali, masing-masing sebanyak 2 mL. Fase organik dikumpulkan dan selanjutnya dipekatkan pada suhu 50 °C sampai kira-kira didapat larutan sebanyak 2 mL (Fase organik A). Fase organik yang diperoleh diekstraksi dengan larutan 0,1 N KOH sebanyak 2 kali, masing-masing sebanyak 1 mL. Fase air dikumpulkan dan selanjutnya diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform/etanol (9:1, v/v) sebanyak 2 kali, masing-masing sebanyak 2 mL. Fase organik dikumpulkan dan dijadikan satu dengan fase organik A, kemudian semua fase organik ini diuapkan pada suhu 50 °C sampai kering, residu yang didapat dilarutkan dalam 1,0 mL metanol 30%. Larutan yang sudah dibuat, disaring menggunakan *millipore* dan diawadarkan menggunakan ultrasonikator selama 15 menit. Larutan ini siap untuk diinjeksikan pada sistem KCKT kondisi optimum yang didapat untuk dianalisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi sistem KCKT pada penelitian ini dilakukan dengan memodifikasi komposisi dan kecepatan alir fase gerak campuran metanol : amonium asetat. Penggunaan campuran fase gerak ini mengacu pada penelitian Bhalala⁽²²⁾ yang menganalisis COT dalam plasma menggunakan metode KCKT MS/MS. Fase diam yang digunakan oleh Bhalala⁽²²⁾ berupa kolom oktadesilsilan (C18) dengan fase gerak amonium asetat 10 mM dalam metanol 30%. Pada penelitian ini dilakukan analisis kotinin dan 3-hidroksikotinin dalam urin dan digunakan kolom C8 *fully endcapped residual silanol*, oleh karena itu perlu dilakukan optimasi pemisahan sistem KCKT yang akan digunakan. Penggunaan kolom jenis ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya interaksi yang terjadi antara gugus piridin yang terdapat dalam COT dan 3-HT dengan residu silanol yang mungkin masih ada dalam kolom. Kondisi optimum sistem KCKT pada penelitian ini yang dapat memisahkan COT, 3-HCOT dan SI adalah campuran metanol : amonium asetat 5 mM pada perbandingan 50:50 pada kecepatan alir 0,8 mL/menit.

Puncak ketiga senyawa dalam kromatogram mempunyai nilai t_R kurang dari 2, hal ini menunjukkan bahwa ketiga senyawa tidak cukup kuat tertahan dalam kolom dan dapat keluar dengan serentak dari kolom⁽²²⁾. Nilai t_R ketiga senyawa pada Gambar 2 adalah kurang dari 10 menit. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga senyawa dapat keluar dengan cepat dari kolom. Nilai t_R kotinin ini lebih cepat daripada hasil penelitian yang



Gambar 2. Kromatogram campuran senyawa baku: (1) 3-HCOT, (2) COT dan (3) SI menggunakan sistem KCKT yang optimum (fase diam kolom Premier C8 fully endcapped residual silanol: 250×4,6 mm, 5µm; fase gerak campuran metanol:amonium asetat 5 mM pada perbandingan 50:50, kecepatan alir 0,8mL/menit; detektor UV 260 nm). Komposisi campuran pada data 1-5 disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi campuran baku data 1-5 Gambar 1.

Data	Campuran baku		
	3-HCOT (µg/mL)	COT (µg/mL)	SI (µg/mL)
1	5	10	1
2	4	8	1
3	3	6	1
4	2	4	1
5	1	2	1

dilakukan oleh *Page-Sharpe*⁽²¹⁾, pada penelitiannya kotinin keluar pada menit ke 20.

Pada kromatogram Gambar 2, terlihat bahwa senyawa 3-HCOT adalah paling cepat keluar ($t_R=3,97$ menit), disusul COT ($t_R=4,63$) dan yang paling lama keluar dari kolom adalah SI ($t_R=6,95$ menit). Waktu retensi dari suatu senyawa sangat dipengaruhi oleh interaksinya dengan fase diam dan fase gerak yang digunakan. Pada penelitian ini sistem KCKT yang digunakan adalah kromatografi fase terbalik, sehingga

semakin polar suatu senyawa maka interaksi dengan fase geraknya akan semakin kuat dan akan lebih mudah keluar dari kolom. Gambar 3 menunjukkan gugus polar yang dimiliki oleh ketiga analit.

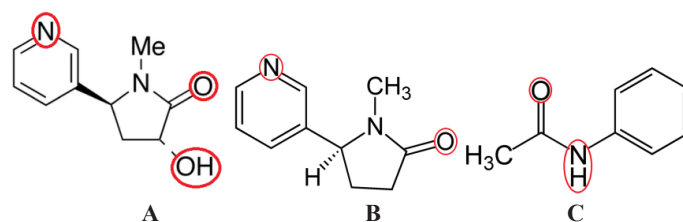
Ketiga senyawa, 3-HCOT, COT dan SI, pada sistem kromatografi yang digunakan dapat memisah dengan sempurna. Hal ini ditunjukkan dengan nilai R_s masing-masing senyawa terhadap senyawa lainnya. Pemisahan yang baik ditunjukkan dengan nilai $R_s >2,0$. Nilai R_s 3-HCOT terhadap COT adalah 2,67; sedangkan nilai R_s COT terhadap SI adalah 8,84. Nilai R_s juga menunjukkan selektivitas metode yang digunakan, dimana dengan nilai $R_s >2,0$ mengidentifikasi bahwa masing-masing senyawa dapat terpisah dengan baik dengan senyawa yang lain dan respon masing-masing senyawa tidak dipengaruhi oleh senyawa yang lain⁽²²⁾.

Sampel biologis yang dianalisis pada penelitian ini berupa sampel urin dari subyek uji perokok. Preparasi merupakan langkah yang sangat penting pada analisis

Tabel 2. Nilai t_R dan t_R 3-HCOT, COT serta SI pada berbagai tingkat kadar.

Senyawa	Kadar (µg/mL)	t_R (rata-rata ± SD)	CV (%)	t_R (mnt) (rata-rata ± SD)	CV (%)
3-HCOT	1	1,691 ± 0,045	1,42	3,968 ± 0,005	0,126
	2	1,699 ± 0,019	1,14	3,967 ± 0,006	0,151
	3	1,705 ± 0,017	1,00	3,968 ± 0,007	0,176
	4	1,707 ± 0,022	1,32	3,968 ± 0,007	0,176
	5	1,692 ± 0,026	1,55	3,967 ± 0,006	0,151
COT	2	1,740 ± 0,010	0,57	4,626 ± 0,014	0,303
	4	1,731 ± 0,017	1,01	4,625 ± 0,015	0,324
	6	1,737 ± 0,024	1,40	4,625 ± 0,015	0,324
	8	1,736 ± 0,027	1,55	4,625 ± 0,015	0,324
	10	1,730 ± 0,001	0,08	4,624 ± 0,015	0,324
SI	1	1,577 ± 0,013	0,85	6,953 ± 0,006	0,088

Keterangan: masing-masing senyawa dalam setiap kadar direplikasi sebanyak 5 kali.

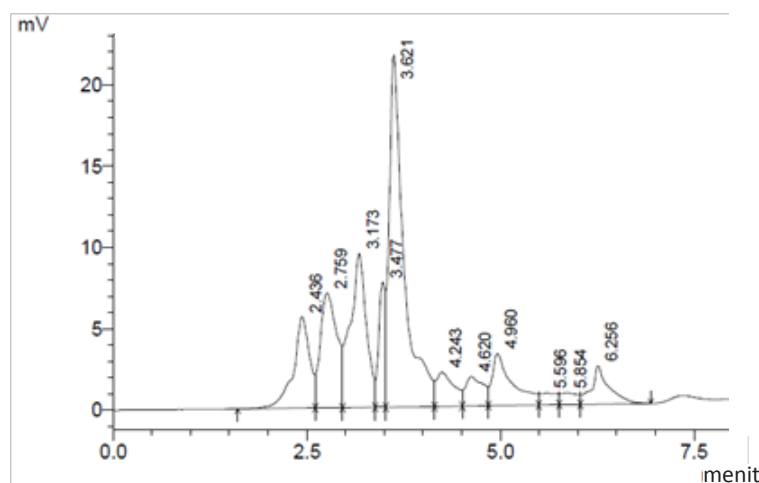


Gambar 3. Senyawa 3-HCOT(A), COT (B) dan SI (C) dengan gugus polarinya (O).

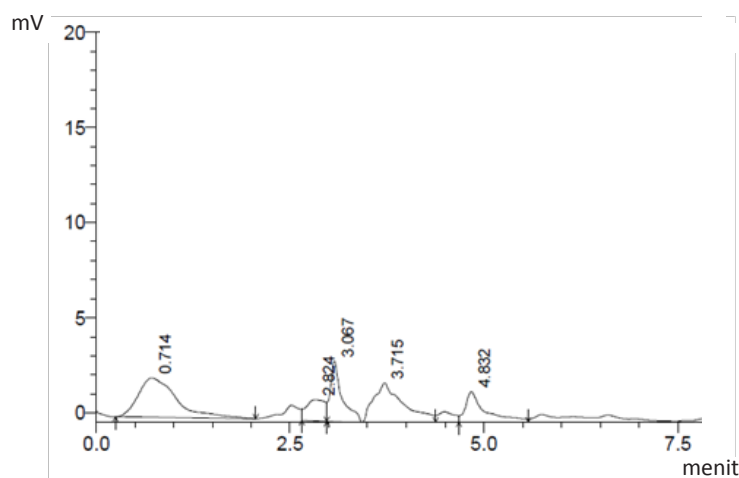
sebelum larutan sampel dianalisis menggunakan metode KCKT. Teknik preparasi urin pada penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Wen⁽¹⁰⁾ Pada penelitian ini, ekstraksi tidak dilakukan dalam satu tahap seperti yang dilakukan oleh Wen⁽¹⁰⁾ tetapi dilakukan ekstraksi secara bertingkat.

Hasil ekstraksi satu tahap sampel urin, yang ditunjukkan pada Gambar 4, memperlihatkan bahwa di daerah analit yang akan diteliti, pada menit ke 3-5 masih terdapat puncak-puncak senyawa lain yang mungkin dapat mengganggu analisis. Ekstraksi bertahap pada

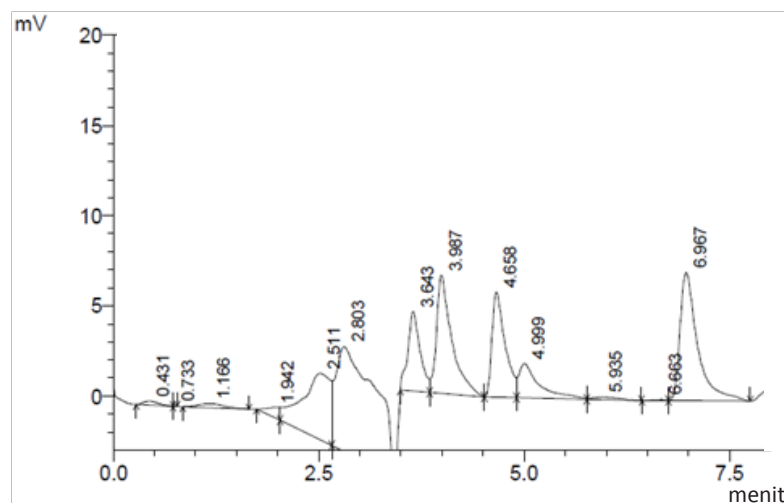
penelitian ini dilakukan untuk mengurangi adanya senyawa-senyawa lain pada sampel yang akan diinjeksikan ke sistem KCKT. Ketiga senyawa yang dianalisis larut dalam pelarut kloroform dan etanol, oleh karena itu kloroform digunakan sebagai pelarut pengekstrak ketiga senyawa⁽¹²⁾. Untuk meningkatkan kelarutan senyawa dalam pelarut organik yang digunakan maka dilakukan penambahan etanol ke dalam pelarut kloroform. Adapun perbandingan antara kloroform dan etanol adalah 9:1. Pada ekstraksi tahap pertama ini, selain ketiga senyawa yang dianalisis



Gambar 4. Kromatogram urin blanko dengan teknik ekstraksi satu tahap (fase diam kolom Premier C8 *fully endcapped residual silanol*: 250×4,6 mm, 5µm; fase gerak campuran metanol : amonium asetat 5 mM pada perbandingan 50:50, kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor UV 260 nm).



Gambar 5. Kromatogram urin blanko (fase diam kolom Premier C8 *fully endcapped residual silanol*: 250×4,6 mm, 5µm; fase gerak campuran metanol : amonium asetat 5 mM pada perbandingan 50:50, kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor UV 260 nm).



Gambar 6. Kromatogram urin sampel perokok (fase diam kolom Premier C8 *fully endcapped residual silanol*: 250×4,6 mm, 5 µm; fase gerak campuran metanol : amonium asetat 5 mM pada perbandingan 50:50, kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor UV 260 nm). Puncak 3-HCOT, COT, SI masing-masing pada menit ke 3,987, 4,658, dan 6,967.

beberapa senyawa organik lain juga ikut larut dalam fase organik. Beberapa senyawa yang mungkin ikut masuk ke dalam fase organik ini adalah asam-asam organik dan senyawa-senyawa organik yang bersifat netral. Adanya senyawa organik lain yang masuk ke dalam fase organik akan mengganggu analisis, oleh karena itu pada tahap selanjutnya dilakukan ekstraksi pada fase organik menggunakan larutan KOH 0,1 N.

Gambar 5 menunjukkan bahwa adanya puncak-puncak pada menit ke 3-5 mampu dikurangi/dihilangkan setelah dilakukan ekstraksi balik menggunakan larutan NaOH 0,1 N. Untuk menegaskan kembali bahwa preparasi yang dilakukan sudah cukup optimal dalam membersihkan sampel dari senyawa-senyawa yang akan mengganggu analisis, maka teknik preparasi urin blanko digunakan untuk preparasi sampel urin dari subyek uji perokok.

Pada Gambar 6 dapat dipastikan bahwa preparasi urin menggunakan teknik ekstraksi cair-cair yang dilakukan dapat menghasilkan larutan sampel yang cukup baik, karena beberapa puncak yang terdapat dalam urin sampel tidak mengganggu respon ketiga senyawa yang dianalisis.

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka kondisi optimum sistem KCKT yang diperoleh selanjutnya dapat digunakan untuk analisis 3-HCOT dan COT dalam sampel urin; khususnya dalam studi penotipe enzim CYP2A6 maupun pada analisis rutin COT dalam urin untuk kepentingan analisis terjadinya paparan nikotin dalam tubuh seseorang.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa kondisi optimum sistem KCKT fase terbalik

menggunakan kolom Premier C8 (250×4,6 mm, 5 µm *fully endcapped residual silanol*) yang dapat memisahkan COT dan 3-HCOT dalam sampel urin adalah fase gerak campuran metanol : amonium asetat 5 mM (50 : 50) kecepatan alir: 0,8 mL/menit; detektor UV: 260 nm serta volume injeksi: 20 µL. Teknik ekstraksi cair-cair bertingkat menggunakan pelarut campuran kloroform : etanol (9:1) yang digunakan pada penelitian ini dapat mengisolasi dengan baik 3-HCOT dan COT dari sampel urin.

DAFTAR PUSTAKA

1. Benowitz NL and Jacob P. Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther.* 1994. 56:483-93.
2. Jacob P, Yu L, Duan M, Ramos L, Yturalde O, Benowitz NL. Determination of the nicotine metabolites cotinine and trans-3-hydroxycotinine in biologic fluids of smokers and non-smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Biomarkers for tobacco smoke exposure and for phenotyping cytochrome P450 2A6 activity. *J Chromatogr B.* 2011. 879:267-76.
3. Tuomi T, Johnsson T, and Reijula K. Analysis of nicotine, 3-hydroxycotinine, cotinine and caffeine in urine of passive smokers by HPLC-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 1999. 45:2164-72.
4. Benowitz NL, Pomerleau OF, Pomerleau CS, Jacob P. Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. *Nicotine Tob Res.* 2003. 5:621-4.
5. Derby KS, Cuthrell K, and Caberto C. Nicotine metabolism in three ethnic/racial groups with different risks of lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008. 17:3526-35.
6. Sellers EM and Tyndale RF. Mimicking gene defects to treat drug dependence. *Ann NY Acad Sci.* 2000. 909:233-46.



7. Kubota T, Nakajima-Taniguchi C, Fukuda T, Funamoto M, Maeda M, Tange I E, *et al.* CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. *The Pharmacogenomics J.* 2006. 6:115-9.
8. Massadeh AM, Gharaibeh AA, and Omari KW. A single-step extraction method for the determination of nicotine and cotinine in Jordanian smokers' blood and urine samples by RP-HPLC and GC-MS. *J Chromatogr Sci.* 2009. 47:170-7.
9. Rabbaa-Khabbaz L, Daoud RA, and Karam-Sarkis D. A simple, sensitive, and rapid method for the determination of cotinine in urine by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr Sci.* 2006. 44:535-8.
10. Wen YH, Yang PS, and Wu SS. Determination of cotinine in human urine by high-performance liquid chromatography. *JFDA.* 2009. 17(5):357-62.
11. Badran E, Salhab AS, and Al-Jaghbir M. Infant exposure to environmental tobacco smoke: Jordan University Hospital-based study. *Eastern Mediterranean Health J.* 2009. 15(1):39-46.
12. Man CN, Gamb L, Ismail S, Lajis R, Awang R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2006. 844:322-7.
13. Shin H, Kim J, Shin Y, Jee SH. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2002. 769:177-83.
14. Tyrpien K, Wielkoszyn'skia T, Janoszkaa B, Dobosza C, Bodzek D, Stepiewski Z. Application of liquid separation techniques to the determination of the main urinary nicotine metabolites. *J Chromatogr A.* 2000. 870:29-38.
15. Bao Z, He X, Ding X, Prabhu S, and Hong J. Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *DMD.* 2005. 33:258-61.
16. Doctor PB, Gokani VN, Kulkarni PK, Parikh JR, Saiyed HN. Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J Chromatogr B.* 2004. 802:323-8.
17. Baumanna F, Regenthala R, Burgos-Guerrero IL, Hegerlb U, Preiss R. Determination of nicotine and cotinine in human serum by means of LC/MS. *J Chromatogr B.* 2010. 878:107-11.
18. Meger M, Meger-Kossien I, Schuler-Metz A, Janket D, Scherer G. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2002. 778:251-61.
19. Moyer TP, Charlson JR, Enger RJ, Dale LC, Ebbert JO, Schroeder DR, and Hurt RD. Simultaneous analysis of nicotine, nicotine metabolites, and tobacco alkaloids in serum or urine by tandem mass spectrometry, with clinically relevant metabolic profiles. *Clin Chem.* 2002. 48:1460-71.
20. Shakleya DM, Huestis MA. Simultaneous and sensitive measurement of nicotine, cotinine, trans-3-hydroxycotinine and norcotinine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.* 2009. 877:3537-42.
21. Page-Sharp M, Hale TW, Hackett LP, Kristensen JH, Ilett KF. Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B.* 2003. 796:173-80.
22. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography. 3th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. 51-9, 222, 327.
23. Bhalala O. Detection of cotinine in blood plasma by HPLC MS/MS. *MURJ.* 2003. 8:45-50.