18/0230/47

การใช้เทคนิค HPLC วิเคราะห์สารโคตินีนในปัสสาวะ เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการได้รับควันบุหรี่ในคนไทย

*นฤมล เลาหเรืองปัญญา**

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณสารโคตินีนในปัสสาวะซึ่งเป็นเมแทบอไลท์ของสารนิโคตีนด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี พบว่าสามารถสกัดสารโคตินีนออกจากปัสสาวะได้ง่ายด้วยตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนผสมรวมกับสารละลายที่เป็นด่างแก่ และแยกสารโดยใช้คอลัมน์ C8-reverse phase สารโคตินีนจะแยกออกจากคอลัมน์ ณ เวลา 6.0 ± 0.14 นาที เมื่อใช้โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ (60 mM) : เมทานอล (60:40, โดยปริมาตร) เป็นตัวพา ที่อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที ประสิทธิภาพของการแยกสกัดสารเท่ากับร้อยละ 110 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ 3.4 และค่าความเข้มข้นของสารโคตินีนต่ำสุดที่วัดได้เท่ากับ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการแยกสารโคตินีนในปัสสาวะของอาสาสมัครที่จำแนกตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่เป็นกลุ่มผู้ไม่สูบบุหรี่ กลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่แต่คิดว่าอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีควันบุหรี่ กลุ่มของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำ และกลุ่มผู้ที่เคยสูบบุหรี่มาก่อนแต่ปัจจุบันเลิกสูบแล้ว พบระดับโคตินีนในปัสสาวะมีค่าเท่ากับ 101.84 ± 28.04 (n= 56), 107.63 ± 19.94 (n=17), 918.69 ± 119.58 (n= 32), และ 137.71 ± 30.42 (n= 20) นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ระดับสารโคตินีนในปัสสาวะของผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำมีความสัมพันธ์แบบแปรตามกับปริมาณบุหรี่ที่สูบต่อวันอย่างมีนัยสำคัญ ($r=0.64$, $p<0.001$) เทคนิคเอชพีแอลซีนี้สามารถใช้วิเคราะห์สารโคตินีนในปัสสาวะเพื่อติดตามผลของการสูบบุหรี่ต่อสุขภาพของคนไทยได้

คำสำคัญ: โคตินีน, ตัวบ่งชี้การได้รับควันบุหรี่, การวิเคราะห์, ปัสสาวะ, ลิควิดโครมาโตกราฟี

*ห้องปฏิบัติการเครื่องมือรวม สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนวิภาวดี-รังสิต หลักสี่ กรุงเทพมหานคร 10210
ติดต่อได้ที่ narumon@tubtim.cri.or.th, โทรศัพท์ 0 2574 0622 ต่อ 3209, โทรสาร 0 2574 2027

Thai J Health Res 18(2), 2004

THE USE OF HPLC TECHNIQUE FOR URINARY COTININE ASSAY AS A BIOMARKER OF SMOKING EXPOSURE IN THAI PEOPLE

*Narumon Laohareungpanya**

Abstract

HPLC technique is developed to assay a level of urinary cotinine, the major metabolite of nicotine. With the vigorous mixing of strong base and dichloromethane, the cotinine in urine can be easily extracted and separated by C8 – reverse phase HPLC. A retention time of cotinine is 6.0 ± 0.14 min when separated in the condition of mobile phase; 60mM sodium acetate buffer: methanol (60 : 40, v/v), flow rate 0.7 ml/min. Percentage recovery and coefficient of variation for the technique are 110 and 3.4, respectively. The limit of quantitation of the method is 50 ng/ml. In the present study, the mean urinary cotinine levels in the nonsmoking, the passive smoking, the smoking, and the stop smoking groups are 101.84 ± 28.04 (n= 56), 107.63 ± 19.94 (n=17), 918.69 ± 119.58 (n=32), and 137.71 ± 30.42 (n= 20) ng/ml, respectively. A positive correlation between cotinine levels measured by this method and amount of tobaccos smoked per day in the smoking group is found significantly ($r=0.64$, $p<0.001$). This HPLC technique for assay of urinary cotinine can be used to monitor effect of tobacco smoke on the health in Thai people.

Key words: cotinine, smoking indicator, analysis, urine, liquid chromatography

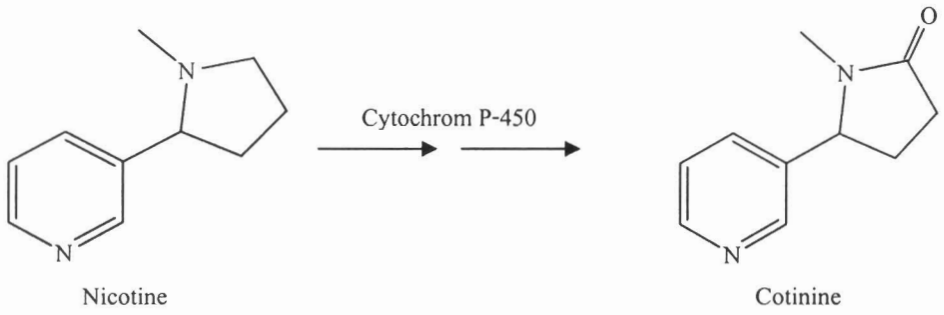
*Instrumental facilities laboratory, Chulabhorn Research Institute, Vipavadee-Rangsit Highway, Laksi, Bangkok 10210, Thailand.

Correspondence to narumon@tubtim.cri.or.th, Tel. 0 2574 0622 ext. 3209, Fax. 0 2574 2027

Original Article

บทนำ

ปัญหาพิษของควันบุหรี่ต่อสุขภาพได้กลายเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขของประเทศไทยปัญหาหนึ่ง เนื่องจากพบว่าในประเทศไทยมีประชากรที่สูบบุหรี่มากถึง 10.2 ล้านคน[1] บุหรี่นั้นมีสารประกอบต่างๆที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพอยู่ไม่ต่ำกว่า 42 ชนิด และสารพิษเหล่านี้เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคปอดเรื้อรัง มะเร็งปอด มะเร็งหลอดอาหาร และมะเร็งกล่องเสียง[2] ในผู้ที่ได้รับควันบุหรี่จากการสูบบุหรี่โดยตรงหรือจากสิ่งแวดล้อม ทำให้รัฐบาลต้องสูญเสียงบประมาณจำนวนมากเพื่อรักษาโรคต่างๆ เหล่านี้ อันเกิดจากการได้รับควันบุหรี่



รูปที่ 1 โครงสร้างเคมีของสารนิโคตีนและโคตินีนที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของเอนไซม์ไซโทโครม P-450

โคตินีน (cotinine) เป็นเมแทบอไลท์ (metabolite) ที่สำคัญของสารนิโคตีน (รูปที่ 1) ที่มีอยู่ในบุหรี่ทั่วไป มีค่าครึ่งชีวิตที่ค่อนข้างนาน (ประมาณ 24 ชั่วโมง) และสามารถตรวจพบได้ในเส้นผม เลือด น้ำลาย และปัสสาวะ ดังนั้นสารโคตินีนนี้จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการได้รับควันบุหรี่ที่เข้าสู่ร่างกายได้[3] การวัดปริมาณโคตินีนในวัตถุตัวอย่างมีหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[4] ซึ่งเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปที่ใช้ง่ายสะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องเสียเวลาแยกสกัดสาร มีความไวในการตรวจวัดสูง ใช้ตัวอย่างตรวจในปริมาณน้อยมาก แต่ยังไม่มีการนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย เทคนิค Gas chromatography - mass spectroscopy (GC-MS)[5] ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะและความไวสูงมาก แต่ต้องเสียเวลาในการแยกสกัดสาร และเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์และการดูแลรักษาสูงมาก จึงไม่ค่อยมีการใช้อย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทั่วไป และเทคนิค High performance liquid chromatrography (HPLC)[6,7] ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ที่ใช้กันมากโดยทั่วไปในห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ต่างๆ มีความจำเพาะในการตรวจวัดค่อนข้างสูง ในขณะที่มีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำกว่าเทคนิค GC-MS ดังนั้น การวัดปริมาณสารโคตินีนโดย HPLC จึงเป็นเทคนิครองที่น่าจะเหมาะสม การศึกษาในครั้งนี้จึงได้พัฒนาวิธีตรวจวัดสารโคตินีนในปัสสาวะด้วยเครื่อง HPLC

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

กลุ่มตัวอย่าง

ตัวอย่างปัสสาวะจากอาสาสมัครชายหญิงทั้งหมด 125 คน ถูกเก็บครั้งเดียวในเวลาเย็น (~16.00 - 17.00 น.) ตัวอย่างปัสสาวะจะถูกจำแนกตามลักษณะการสูบบุหรี่ซึ่งได้จากการตอบแบบสอบถามได้เป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้ คือ

1. กลุ่มผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่ และไม่คิดว่าตนเองจะได้รับควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อม
2. กลุ่มผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่ แต่คิดว่าอาจจะได้รับควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น บุคคลรอบข้าง ที่ทำงาน บ้าน หรือ ร้านอาหาร
3. กลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำอย่างน้อย 1 มวนต่อสัปดาห์ และ
4. กลุ่มผู้ที่เคยสูบบุหรี่มาก่อนแต่ปัจจุบันเลิกสูบแล้วนาน 1 เดือนขึ้นไป

สารเคมี

Cotinine (C 5923, Sigma), dichloromethane (21,303-9, Aldrich), 100% acetic acid (AR grade, 100063, Merck), Sodium acetate (AR grade, 1.06267.1000, Merck), methanol (LC grade, 1.06007, Labscan)

การวิเคราะห์

ขั้นตอนการสกัด

ดูดปัสสาวะ 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแก้วที่มีขนาด 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างแก่โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเติมตัวทำละลายไดคลอโรมีเทนลงไปผสมอีก 5 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง Vortex mixer เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมแยกชั้นด้วยอัตรา 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาสารผสมชั้นบนออกทิ้งไป แล้วดูดส่วนของไดคลอโรมีเทนที่อยู่ชั้นล่างปริมาณ 3 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดทดลองแก้วใหม่ขนาด 5 มิลลิลิตร นำไประเหยให้แห้งด้วยแกสไนโตรเจนบริสุทธิ์ 99.5% ที่อุณหภูมิห้องจนแห้งสนิท แล้วนำไปละลายด้วยโซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ pH 4.3 ปริมาณ 300 ไมโครลิตร กรองสารที่ละลายด้วยตัวกรอง nylon ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

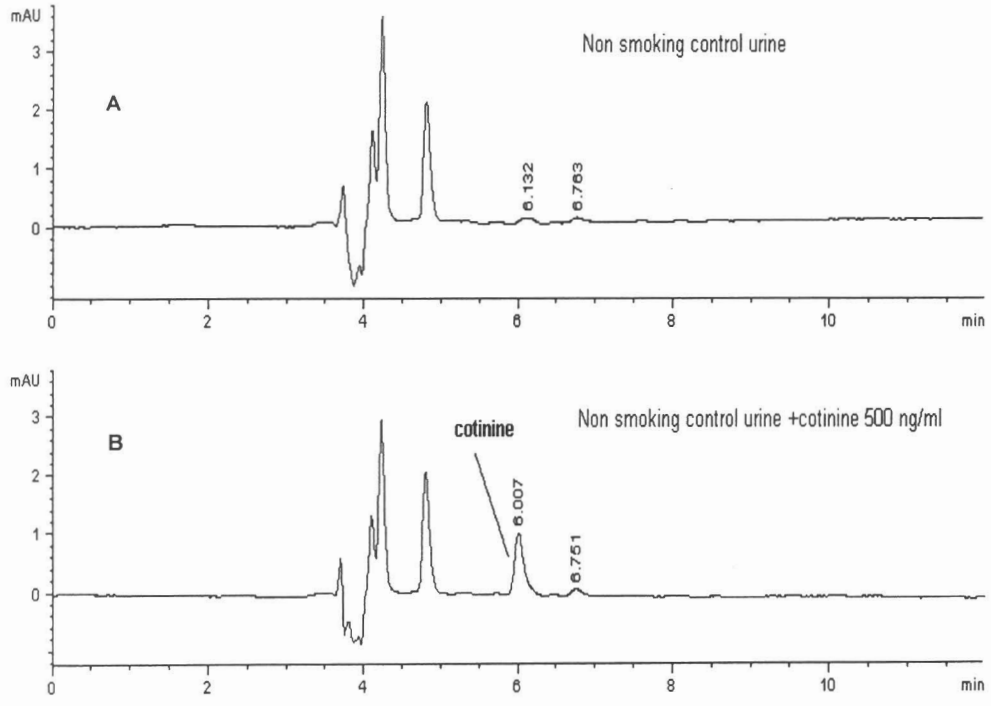
สภาวะที่ใช้แยกสารโคตินีนด้วย HPLC

- Column: Phenomenex Luna 5 u C8 (2) 250 x 4.6 mm, temperature 30 °c
- Mobile phase: 60mM Na acetate buffer pH 4.3: methanol (60:40, v/v)
  flow rate 0.7 ml/min, pressure 206 bar
- Detection: photo diode array UV @ 260 nm
- Injection volume: 20 µl

ผล

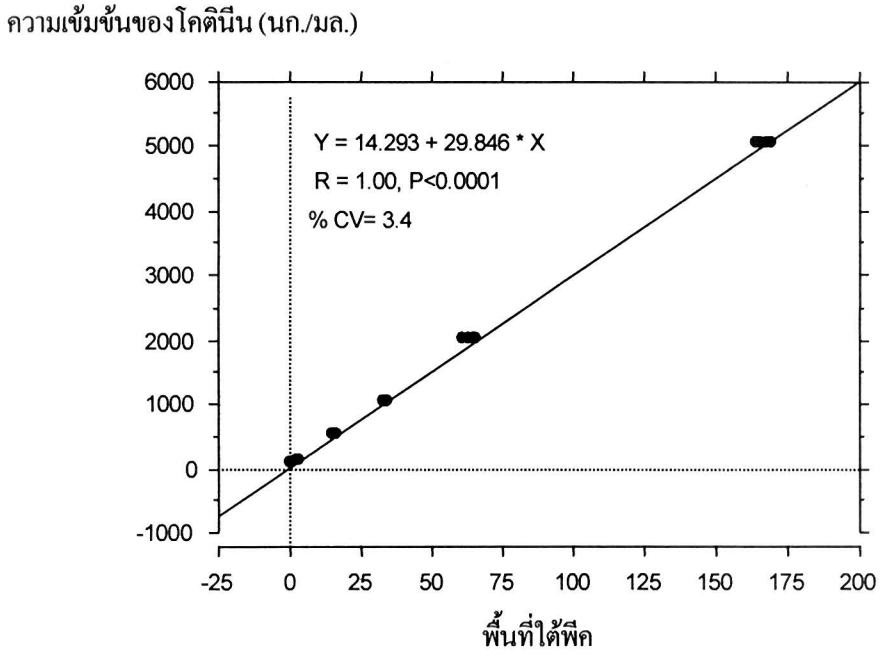
ประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารโคตินีนในปัสสาวะ

การแยกสารมาตรฐานโคตินีนที่เติมในปัสสาวะของผู้ที่ไม่ได้รับควันบุหรี่ (control urine) ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารมาตรฐานโคตินีนออกที่เวลา 6.0 ± 0.14 นาที (รูปที่ 2) และค่าความเข้มข้นของสารโคตินีนต่ำสุดที่ให้ค่าสัญญาณของพีคโคตินีนต่อสัญญาณรบกวน = 3 : 1 (limit of detection) คือ 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ประสิทธิภาพของการแยกสกัดสารมาตรฐานโคตินีนความเข้มข้นต่าง ๆที่เติมลงไปในปัสสาวะมีค่าร้อยละ 110 ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวนร้อยละ 3.4



รูปที่ 2 โครมาโตแกรมของปัสสาวะที่ไม่ได้เติมสารมาตรฐานโคตินีน (A) เปรียบเทียบกับปัสสาวะที่เติมสารมาตรฐานโคตินีน 500 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (B) พบพีคโคตินีนที่เวลา 6.0 ± 0.14 นาที

ความเข้มข้นของสารโคตินีนในปัสสาวะต่ำสุดที่วิธีนี้สามารถแยกสกัดและตรวจวัดได้อย่างถูกต้อง (limit of quantitation) คือ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และช่วงความเข้มข้นของสารโคตินีนที่วัดได้เป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับพื้นที่ใต้พีคของ HPLC มีค่าตั้งแต่ 50-5,000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 3)

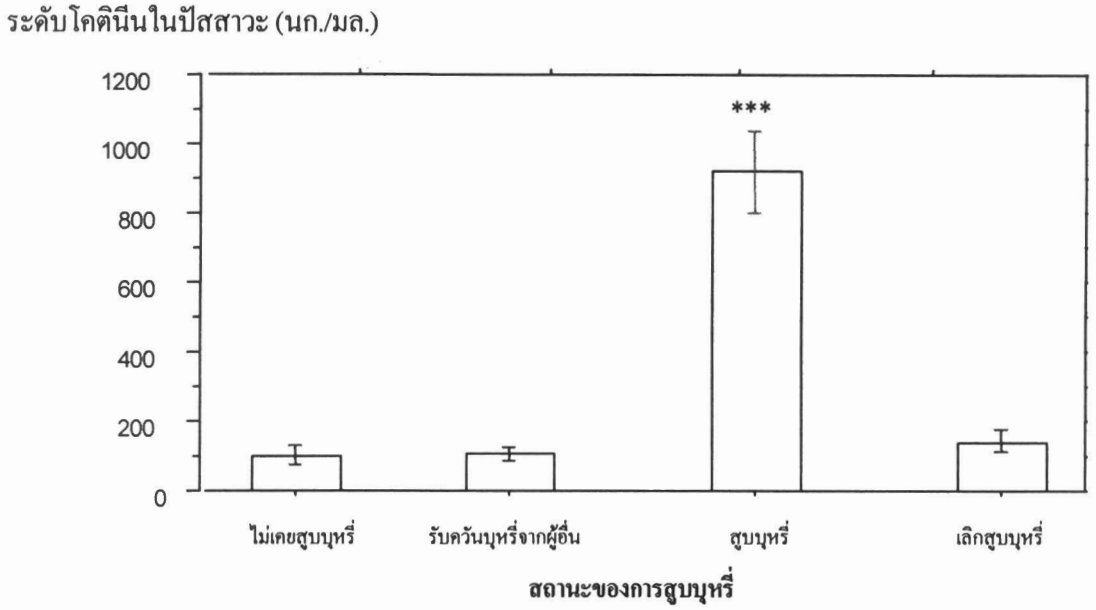


รูปที่ 3 ค่าพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ จากการใส่สารมาตรฐานโคตินีนลงในปัสสาวะปริมาณ 2 มิลลิลิตร ที่เก็บเป็น control blank จำนวน 6 ความเข้มข้น คือ 50, 100, 500, 1000, 2000 และ 5000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

ผลการวิเคราะห์สารโคตินีนในปัสสาวะของกลุ่มอาสาสมัครจำแนกตามพฤติกรรมการสูบบุหรี่

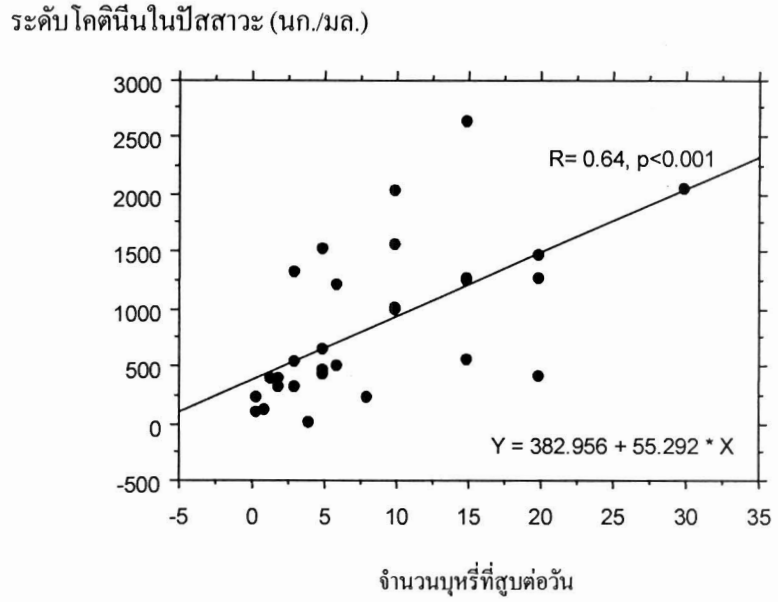
การทดลองเก็บตัวอย่างปัสสาวะเพื่อวัดปริมาณสารโคตินีนในอาสาสมัครจำนวน 125 คน พบว่า ในปัสสาวะของกลุ่มที่ไม่เคยสูบบุหรี่และไม่คิดว่าตนจะได้รับควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อม จำนวน 56 คน ตรวจพบโคตินีนในปัสสาวะมีระดับตั้งแต่น้อยกว่า 50 จนถึง 1,200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยประมาณ 101.84 ± 28.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และในกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่แต่คิดว่าได้รับควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อมจำนวน 17 คน มีค่าเฉลี่ยโคตินีน 107.63 ± 19.944 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยตรวจพบโคตินีนในปัสสาวะมีค่าตั้งแต่ <50 ถึง 345.49 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะ

ที่ผู้สูบบุหรี่เป็นประจำจำนวน 32 คน มีค่าเฉลี่ยโคตินีนในปัสสาวะสูงถึง 918.69 ± 119.582 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โดยมีช่วงการวัดตั้งแต่ 80.79 ถึง 2609.52 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และในกลุ่มผู้ที่เลิกสูบบุหรี่ไปแล้วจำนวน 20 คน มีค่าเฉลี่ยโคตินีน 137.71 ± 30.42 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมีช่วงการวัดตั้งแต่ <50 ถึง 539.26 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ระดับโคตินีนในปัสสาวะของอาสาสมัครกลุ่มต่างๆ คือ 1) กลุ่มที่ไม่เคยสูบบุหรี่ (n=56); 2) กลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่แต่คิดว่าได้รับควันบุหรี่จากผู้อื่น (n=17); 3) กลุ่มที่สูบบุหรี่เป็นประจำ (n=32); 4) กลุ่มที่เลิกสูบบุหรี่แล้ว (n=20) เครื่องหมาย I แสดงค่า mean ± SE, *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่สูบบุหรี่กับกลุ่มอื่นๆ ที่ $p<0.0001$ (unpaired – T test)

เมื่อนำปริมาณสารโคตินีนที่ตรวจพบในปัสสาวะของคนที่สูบบุหรี่เป็นประจำไปหาความสัมพันธ์กับจำนวนบุหรี่ที่ใช้สูบต่อวันในแต่ละคน พบว่าระดับสารโคตินีนในปัสสาวะของกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่เป็นประจำมีความสัมพันธ์แบบแปรตามกับปริมาณบุหรี่ที่สูบต่อวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.64$, $p<0.001$) (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับโคตินีนในปัสสาวะกับจำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวัน ในกลุ่มที่สูบบุหรี่เป็นประจำแต่ละคน (n=32)

วิจารณ์

สารโคตินีนในปัสสาวะสามารถตรวจวัดได้ง่ายโดยวิธี HPLC และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณควันบุหรี่ที่ได้รับเข้าไปในร่างกายได้ดี แม้ว่าการวิเคราะห์สารโคตินีนด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปในปัจจุบันจะเป็นที่นิยมในต่างประเทศ แต่เนื่องจากชุดตรวจโคตินีนสำเร็จรูป ELISA นี้ยังไม่มีการนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย การที่จะพัฒนาแอนติบอดีเพื่อผลิตชุดตรวจสำเร็จรูป ELISA นั้นต้องอาศัยระยะเวลานานพอสมควร ในขณะที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทั่วไปโดยมากจะมีเครื่อง HPLC อยู่แล้ว ดังนั้น HPLC จึงเป็นทางเลือกรองในการที่จะพัฒนาศักยภาพของเครื่องมือที่มีอยู่แล้วในห้องปฏิบัติการให้มีประโยชน์มากขึ้น อีกทั้งผลการวิเคราะห์ สารที่ได้จากเทคนิค HPLC นั้นจะได้ปริมาณวิเคราะห์ที่ชัดเจนแม่นยำ มีความจำเพาะค่อนข้างสูงกว่าการตรวจด้วยเทคนิค ELISA ซึ่งจะได้ค่าการวิเคราะห์เป็นช่วงความเข้มข้นต่างๆ และถึงแม้ว่าค่าความเข้มข้นของสารโคตินีนต่ำสุดที่วัดได้โดยเทคนิค HPLC นี้มีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป (3 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) หรือเทคนิค GC-MS (0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) คือ ที่ระดับ 50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร [3] แต่ยังคงมีประสิทธิผลดีพอในการจำแนกกลุ่มที่สูบบุหรี่เป็นประจำออกจากกลุ่มที่ไม่ได้สูบบุหรี่ ที่มีค่ามาตรฐานในการจำแนกที่ระดับ 200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร [3] ดังนั้นการวิเคราะห์สารโคตินีนใน

ปัสสาวะโดยวิธีนี้ จึงเหมาะที่จะใช้ในงานวิจัยเพื่อศึกษาผลเสียของการสูบบุหรี่ต่อสุขภาพของคนไทยในด้านต่างๆได้ และจากผลการทดลองวิเคราะห์สารโคตินีนในปัสสาวะของอาสาสมัครที่มีพฤติกรรมการสูบบุหรี่แตกต่างกัน ซึ่งจำแนกโดยการตอบแบบสอบถาม พบว่าในกลุ่มผู้ที่ตอบว่าเป็นผู้ที่ไม่เคยสูบบุหรี่จำนวน 56 คน ตรวจพบระดับสารโคตินีนในปัสสาวะซึ่งมีค่ากระจายมากตั้งแต่ <50-1200 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมีค่าเฉลี่ยมาตรฐานในระดับที่เท่ากันกับกลุ่มที่คิดว่าตนเองได้ควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อม แม้ว่าจะไม่ได้เป็นผู้ที่สูบบุหรี่เองก็ตาม คือ ประมาณ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ข้อมูลนี้ได้บ่งชี้ถึงการได้รับควันบุหรี่จากสิ่งแวดล้อม (environmental tobacco smoke, ETS) ซึ่งคนจำนวนหนึ่งไม่ได้ใส่ใจระวังป้องกันตนเองจากพิษของควันบุหรี่ และยังชี้ให้เห็นแนวโน้มอีกว่าในสิ่งแวดล้อมของไทยมีพิษของควันบุหรี่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษา ETS ในประเทศสหรัฐอเมริกา[8] หรือโปแลนด์[9] ซึ่งมีค่าโคตินีนไม่เกิน 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แต่อย่างไร ก็ตาม การศึกษา ETS ในประเทศไทยยังต้องการการศึกษาในกลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนมากกว่านี้

กิตติกรรมประกาศ

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการพิษวิทยาสิ่งแวดล้อม สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในความร่วมมือทางด้านการวิจัยต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. จันทร์เพ็ญ ชูประภาวรรณ. 2543. สุขภาพคนไทย ปี พ.ศ. 2543: สถานะสุขภาพคนไทย. อุษาการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 252-260.
2. Tobacco control country profiles. 2003. World Health Organization, Geneva. p.387. (http://www.who.int/tobacco/resources/publications/en/)
3. Bramer SL, Kallungal BA. 2003. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. Biomarkers 8 (3-4): 187-203.
4. Kuo HW, Yang JS, Chiu MC. 2002. Determination of urine and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 768(2): 297-303.
5. Shin HS, Kim JG, Shin YJ, Jee SH. 2002. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chroatrography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 769(1): 177-183.

6. Ceppa F, Younes El J, Mayaudon H, Dupuy O, Burnat P. 2000. High-performance liquid chromatograhic determination of cotinine in urine in isocratic mode. J Chromatography B 746: 115-122.

7. Greaves R, Trotter L, Brennecke S, Janus E. 2001. A simple HPLC cotinine assay: validation of smoking status in pregnant women. Ann Clin Biochem 38: 333-338.

8. National Center for Environmental Health. 2003. Second national report on human exposure to environmental chemicals. Division of Laboratory Sciences, Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia. NCEH Pub. No. 02-0716. p. 79-80. (http://www.cdc.gov/exposurereport/ tobacco/ pdf/ tobaccosmoke.pdf).

9. Bazylak G, Brozik H, Sabanty W. 2000. HPTLC screening assay for urinary cotinine as biomarker of environmental tobacco smoke exposure among male adolescents. J Pharm Biomed Anal 24:113-123.