

# Validación de un método para la determinación de cotinina en saliva

## Validation of a method for the determination of cotinine in saliva

Blanco Alvarez, Federico M.; Zar, Gamaliel; Tisocco, R. Sebastián

Servicio de toxicología, LACE Laboratorios. Av. Vélez Sarsfield 528, Córdoba (5000),  
Córdoba, Argentina.

fedeblanca@gmail.com

### INTRODUCCIÓN

La nicotina (NIC), un alcaloide natural, es el principal componente psicoactivo del tabaco. Se absorbe principalmente por vía respiratoria y se metaboliza en hígado a metabolitos inactivos: cotinina (70-80) % y nicotina-1-N-óxido. La cotinina (COT) presenta una vida media de 16-20 horas en contraste con las 2-3 horas de vida media de NIC. La determinación de COT puede realizarse en diversas matrices biológicas, siendo la saliva una matriz de elección porque permite una recolección no invasiva para el paciente.

### OBJETIVOS

Validar un método para determinación de COT en saliva.

### MATERIALES Y MÉTODOS

La validación se realizó con base en las recomendaciones propuestas por la guía M10 de ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). Para la validación del método se utilizó un pool de saliva obtenido de personas no fumadoras ni expuestas a humo de cigarrillo en al menos 7 días previos a la recolección de la muestra. El método incluyó una extracción líquido-líquido con cloroformo, evaporación de la fase orgánica, reconstitución del extracto en fase móvil, inyección en un cromatógrafo líquido Agilent 1100 con detector con arreglo de diodos y posterior detección a 205 nm. La fase móvil estuvo compuesta por buffer fosfato pH= 6: acetonitrilo (90:10), flujo de 0,8 mL/minuto, temperatura de columna de 40°C, tiempo de corrida de 7 min. La separación cromatográfica se realizó en una columna LiChrospher 100 RP-18, 5 µm, 3 mm x 125 mm (Agilent Technologies).

### RESULTADOS

El tiempo de retención de COT fue de 4,6 minutos. El método demostró ser selectivo, la especificidad se evaluó con cafeína, teofilina y teobromina no encontrándose interferencias en los tiempos de retención de COT ni del estándar interno. El método presentó un rango de linealidad entre 15 y 200 ng/mL, límite de detección de 4,6 y de cuantificación de 15,4 ng/mL. La evaluación de la precisión fue aceptada tanto intra, como inter-corrida, la recuperación fue del 102% y no se encontró efecto matriz ni error por arrastre. El ensayo de dilución de la muestra a dos factores no evidenció CV mayor al 15 % en los replicados. El analito fue estable a -20 °C durante 15 días en la matriz y por 72 horas a -20°C reconstituido en fase móvil. Se encontró repetibilidad aceptable en las inyecciones sucesivas de un mismo vial.

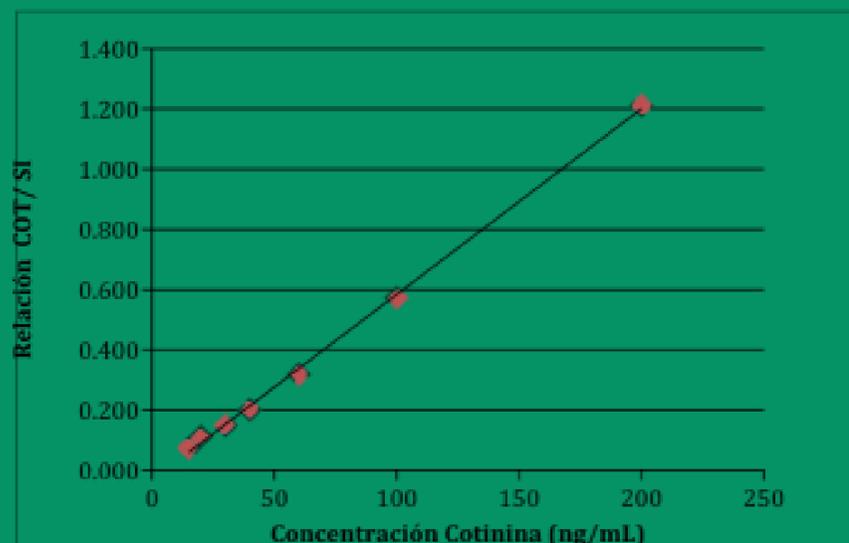


Figura 1: Curva relación (COT/SI) vs concentración de cotinina (ng/mL).

### CONCLUSIÓN

El método validado para la determinación de COT en saliva demostró ser simple, rápido y preciso, lo cual permite su implementación en el laboratorio clínico. Los límites de detección y cuantificación resultan útiles para determinar exposición a NIC puesto que se ha reportado que niveles mayores a 14,7 ng/mL de COT en saliva se relacionan con exposición a NIC.