

Analiza zawartości nikotyny w liściach tytoniu oraz wyrobach tytoniowych z wykorzystaniem techniki elektroforezy kapilarnej (CE) i ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrometrii mas (LC-MS)

WPROWADZENIE

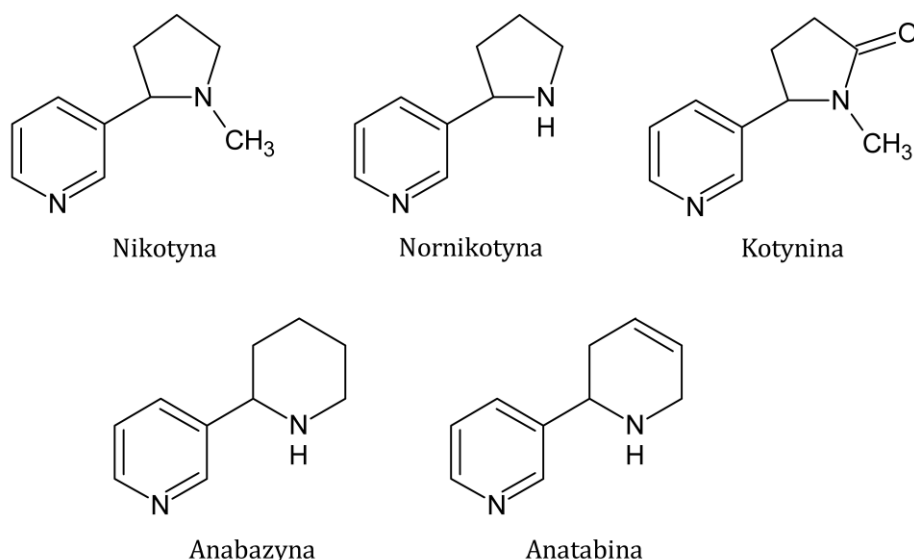
Alkaloidy to niejednorodna grupa związków organicznych, głównie pochodzenia roślinnego lub syntetycznego, zwykle o właściwościach zasadowych ze względu na obecność atomu (lub atomów) azotu, najczęściej w pierścieniach heterocyklicznych. Alkaloidy wykazują szerokie spektrum działania fizjologicznego, od stymulującego (kofeina, lobelina), poprzez narkotyczne (morfina, kokaina), do toksycznego (nikotyna, strychnina). Dla obecnie poznanych ponad 20 000 struktur alkaloidów (występujących u około 20% znanych gatunków roślin wyższych) substratami są cztery aminokwasy naturalne: L-ornityna, L-lizyna, L-feniloalanina i L-tryptofan. Różnorodność budowy chemicznej alkaloidów świadczy o tym, iż nie posiadają one jednorodnego mechanizmu biosyntezy.

Alkaloidy wytwarzane są przez rośliny makowate (*Papaveraceae*), bobowate (*Fabaceae*), jaskrowate (*Ranunculaceae*), psiankowate (*Solanaceae*) oraz niektóre rośliny niższe, takie jak widłaki czy skrzypy. Gromadzone są najczęściej w liściach, owocach i nasionach, a także w kwiatach, korzeniach, bulwach oraz w korze. Ich zawartość waha się od ilości śladowych do 10%, jak to ma miejsce w przypadku chininy w korze chinowca. W świecie zwierząt obecność alkaloidów stwierdzono u owadów, salamander, niektórych żab i wijów. U owadów są one zwykle pochodzenia wtórnego – pobierane wraz z pokarmem stanowią ochronę przed drapieżnikami. Spośród wielu roślin psiankowatych na szczególną uwagę zasługuje tytoń, uprawiany na masową skalę od końca XIX wieku jako popularna używka służąca do wyrobu papierosów.

Tytoń pozyskiwany jest z dwóch gatunków roślin, mianowicie *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana rustica*, oba pochodzą z Andów Peruwiańskich i Ekwadorskich. Tytoń stosowano na wiele sposobów: palono w fajkach, wdychano, żuto, zjadano, spożywano jako herbatę, stosowano do płukania jelit, rozcierano na skórce w celu zwalczania wszy, wkrapłano jako krople do oczu, a także stosowano w maściach, środkach przeciwbólowych oraz środkach antyseptycznych. Zwyczaj palenia tytoniu znany jest od co najmniej trzech tysięcy lat. Chociaż Krzysztof Kolumb odkrył go dopiero gdy dotarł do Ameryki w 1492 roku, to starożytne rzeźby świątynne w Ameryce Środkowej przedstawiają zwyczaj palenia tytoniu już 1 000 lat przed naszą erą.

Powszechnie wiadomo, że dym tytoniowy zawiera ponad 4 000 związków chemicznych, w tym nikotynę, tlenek węgla, benzo[a]piren (prekancerogen występujący w smółce papierosowej), substancje drażniące drogi oddechowe (takie jak akroleina, formaldehyd, fenole) i inne. Związkiem ksenobiotycznym, na który należy zwrócić szczególną uwagę, jest benzo[a]piren, wytwarzany podczas spalania materiałów roślinnych zawierających tytoń, który u ludzi i zwierząt metabolizowany jest do benzo[a]pireno-7,8-dihydrodiolu-9,10-epoksydu, czynnika silnie rakotwórczego. Jednakże większość badań klinicznych pokazuje, że to nikotyna jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój uzależnienia od tytoniu.

Tytoń, oprócz nikotyny, zawiera również wiele innych alkaloidów, w tym ponad 20 różnych substancji, które są pochodnymi nikotyny. Nikotyna jest najliczniejszym spośród lotnych alkaloidów w liściach tytoniu, stanowiącym około 98% całkowitej zawartości alkaloidów. Pozostałe alkaloidy tytoniowe, takie jak nornikotyna, anabazyna, anatabina, kotynina i jeszcze kilka innych związków (Ryc. 1), są również farmakologicznie aktywne, ale wykazują mniejszą aktywność niż nikotyna.

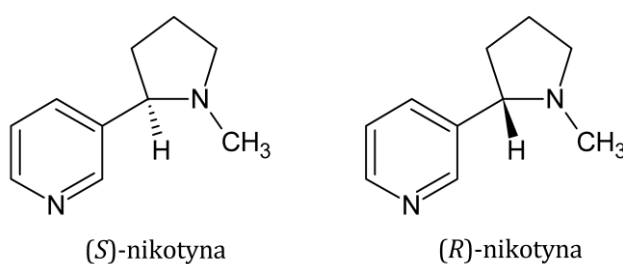


Ryc. 1. Struktura chemiczna wybranych alkaloidów tytoniu

Nikotyna jest organicznym związkiem chemicznym z grupy alkaloidów pirydynowych, zawartym przede wszystkim w różnych gatunkach tytoniu oraz innych roślinach z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), takich jak ziemniaki, pomidory, papryka czy bakłażan. Suche liście tytoniu szlachetnego *Nicotiana tabacum* zawierają od 2 do 8% nikotyny, natomiast tytoń indiański („dziki tytoń”) *Nicotiana rustica* może zawierać nawet do 18% tego alkaloidu.

Po raz pierwszy nikotyna została wyizolowana w 1828 roku zaś jej struktura, 3-(*N*-metylo-2-pirolidynylo)-pirydyny, $C_{10}H_{14}N_2$, została zaproponowana w 1895 roku i potwierdzona w 1904 roku w wyniku syntezy chemicznej. Czysta nikotyna to klarowna oleista ciecz o charakterystycznym, intensywnym zapachu, brunatniejąca na powietrzu (w wyniku utleniania do kwasu nikotynowego). Nikotyna może występować w postaci wolnej zasady lub jako sól dwuchlorowodorkowa, salicyłowa, siarczanowa lub dwuwinianowa. Hydrofobowe właściwości pirydyny i pierścienia pirolidynowego w cząsteczce nikotyny nadają jej charakter lipofilowy, co powoduje dobrą rozpuszczalność tego alkaloidu w lipidach.

Nikotyna jest aminą zbudowaną z dwóch pierścieni heterocyklicznych, pirydyny i pirolidyny, której atom węgla w pozycji 2 stanowi centrum chiralne. W związku z tym obecne są dwa izomery optyczne (enancjomery) nikotyny, które skręcają światło spolaryzowane w przeciwnych kierunkach (Ryc. 2). Poza tym większość właściwości fizycznych oraz chemicznych dla obu enancjomerów jest niemal identyczna. W przypadku nikotyny naturalny produkt jest zdominowany przez lewoskrętny enancjomer (*S*) tradycyjnie nazywany L- lub (-)-nikotyną, natomiast zawartość prawoskrętnego (*R*)-enancjomeru nikotyny (określanego również jako D- lub (+)-nikotyna) zwykle nie przekracza kilku procent (jego aktywność biologiczna jest również około 8 razy mniejsza).



Ryc. 2. Struktura chemiczna enancjomerów nikotyny: (*S*)-nikotyna oraz (*R*)-nikotyna

Nikotyna zwykle stanowi około 5% masy tytoniu. Papieros zawiera od 8 mg do 20 mg nikotyny (w zależności od marki), ale tylko około 1 mg jest faktycznie wchłaniany przez ludzki organizm. Nikotyna działa na nikotynowe receptory cholinergiczne, wpływa na większość układów narządowych w organizmie i jest wysoce uzależniająca. Stwierdzono, że może odgrywać istotną rolę w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i zaburzeniach płodności, a także jest głównym prekursorem wysoce rakotwórczych *N*-nitrozoamin, specyficznych dla tytoniu. Dawka śmiertelna dla ludzi wynosi około 50-100 mg. Ze względu na wyżej wymienione właściwości nikotyna jest ważnym alkaloidem z punktu widzenia zdrowia publicznego.

Znanych jest wiele metod oznaczania nikotyny i jej pochodnych w próbkach biologicznych. Najczęściej stosowane metody obejmują chromatografię cienkwarstwową (TLC), elektroforezę kapilarną (CE), chromatografię gazową (GC) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC).

W metodzie elektroforezy kapilarnej (CE) wykorzystuje się zjawisko elektroforezy, czyli migracji w polu elektrycznym cząstek obdarzonych ładunkiem. Rozdział jonów możliwy jest dzięki różnicom w prędkościach z jakimi migrują one wewnątrz szklanej kapilary. Metoda CE charakteryzuje się niezwykle dużą sprawnością i krótkim czasem separacji, minimalnym zużyciem odczynników (próbek i buforów) oraz pełną automatyką. Przy pomocy CE można analizować zarówno małe jony np. metali, jak również duże makromolekuły, takie jak peptydy, białka czy kwasy nukleinowe. W specyficznych warunkach możliwa jest również analiza molekuł pozbawionych ładunku.

Jednakże technika HPLC wydaje się być najbardziej odpowiednią i czułą metodą, szczególnie w połączeniu z tandemową spektrometrią mas (MS/MS). Nikotyna i jej pochodne należą do grupy polarnych zasadowych cząsteczek, które w obojętnych i kwaśnych roztworach występują głównie w formie kationowej. Z tego względu rozdział tych alkaloidów można przeprowadzić za pomocą techniki HPLC z tworzeniem par jonowych, chromatografii jonowej lub w układzie faz odwróconych (RP) – najczęściej stosowana.

Najbardziej obiecującą, alternatywą w stosunku do RP-HPLC, metodą separacji wysoce polarnych obojętnych cząsteczek oraz cząsteczek obdarzonych ładunkiem jest chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Metoda ta zapewnia wysoką selektywność, dobry kształt piku i wysoką retencję tego typu związków. Uzyskuje się to poprzez zastosowanie fazy ruchomej bogatej w rozpuszczalniki organiczne (np. acetonitryl), w połączeniu z polarną fazą stacjonarną (np. krzemionką lub krzemionką modyfikowaną grupami diolowymi, aminowymi, cyjanopropylowymi). Ponadto, wysoce lotne fazy ruchome bogate w acetonitryl stosowane w metodzie HILIC zapewniają niższe ciśnienie zwrotne na kolumnie, a także zwiększoną czułość detekcji z wykorzystaniem spektrometrii mas, np. z jonizacją przez elektrorozpylenie (ESI-MS). Wysoka efektywność, selektywność i szybkość separacji związków polarnych z wykorzystaniem metody HILIC można dodatkowo zwiększyć przez zastosowanie ultra-wyksokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC), która wykorzystuje kolumny wypełnione ziarnami o średnicy poniżej 2 μm oraz metody separacji z wykorzystaniem wysokich ciśnień (do 1200 barów).

ODCZYNNIKI I SPRZĘT LABORATORYJNY

1. Materiał analizowany: liście tytoniu lub inne produkty zawierające nikotynę (papierosy, tabaka)
2. Probówki typu Falcon o pojemności 15 mL wraz z nakrętką

3. Probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 mL oraz tipsy do mikropipet automatycznych o pojemności 100 μL i 1000 μL
4. Strzykawki plastikowe niesterylne o pojemności 2 mL
5. Filtry strzykawkowe PTFE niesterylne hydrofobowe 0,22 μm o średnicy 13 mm
6. Fiolki o pojemności 2 ml z nakrętką karbowaną 9 mm, z uszczelką PTFE z nacięciem
7. Roztwór wzorcowy zawierający nikotynę rozpuszczoną w mieszaninie woda/acetonitryl/kwas mrówkowy (20/80/0,2 v/v/v), o stężeniu 1 mg/mL
8. Metanol, acetonitryl i kwas mrówkowy (o czystości LC-MS)
9. Woda dejonizowana (przefiltrowana przez filtr PTFE 0,22 μm)
10. Mikropipety o pojemności 100 μL i 1000 μL
11. Wirówka laboratoryjna
12. Wytrząsarka typu Vortex
13. Zestaw do ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrometrii mas (UHPLC-MS)
14. Zestaw do elektroforezy kapilarnej (CE)

WYKONANIE DOŚWIADCZENIA:

A. IZOLACJA NIKOTYNY

Około 100 mg liści tytoniu (suszu lub świeżo zerwanych) lub innego produktu tytoniowego zawierającego nikotynę (tytoń papierosa, tabaka) umieścić w probówce typu Falcon o pojemności 15 mL (**zanotować dokładną masę użytego materiału!**), dodać 8 mL acetonitrylu, 2 mL wody dejonizowanej oraz 20 μL kwasu mrówkowego. Tak przygotowaną mieszaninę wytrząsać przez około 30 sekund, a następnie probówkę umieścić w łaźni ultradźwiękowej na okres około 30 min, w temperaturze pokojowej. Po tym czasie probówkę przenieść do wirówki i odwirować przy 5000 RPM przez 10 minut. 1,5 mL supernatantu przesączyć (filtr strzykawkowy 13 mm PTFE, 0,22 μm) do probówki typu Eppendorf. Następnie 100 μL przesącza przenieść do probówki Eppendorfa i rozcieńczyć 10-krotnie mieszaniną woda/acetonitryl/kwas mrówkowy (20/80/0,1 v/v/v). Przygotowaną w ten sposób próbkę poddać analizie chromatograficznej z wykorzystaniem techniki LC-MS oraz CE.

B. ANALIZA ZAWARTOŚCI NIKOTYNY Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI LC-MS

SPORZĄDZENIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

W celu sporządzenia krzywej wzorcowej przeprowadzić analizy LC-MS roztworów wzorcowych nikotyny otrzymanych przez odpowiednie rozcieńczenie fazą ruchomą roztworu wzorcowego nikotyny o stężeniu 1 mg/mL do następujących stężeń: 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL, 75 ng/mL oraz 100 ng/mL. Na podstawie analizy pól powierzchni pików w otrzymanych chromatogramach wykreślić krzywą wzorcową przedstawiającą zależność powierzchni pików od stężenia wzorca. Otrzymana wartość współczynnika korelacji powinna być większa lub równa 0,995.

WARUNKI ANALIZY

- ultra-wysokosprawny chromatograf cieczowy firmy Shimadzu Nexera X2 wyposażony w dwie pompy, degazer, autosampler, termostat kolumn oraz detektor masowy Shimadzu LCMS-2020
- kolumna: Phenomenex Kinetex HILIC 100 Å (ziarna 2,6 μm) o wymiarach 100×2,1 mm
- objętość dozowania: 2 μL
- temperatura kolumny: 40°C

- faza ruchoma: 78% roztwór acetonitrylu w H₂O z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego
- natężenie przepływu fazy ruchomej: 0,35 mL/min
- czas analizy: 10 min
- temperatura autosamplera: 4°C
- tryb jonizacji detektora MS: dodatnia ESI
- metoda rejestracji widma MS: SIM (przy m/z 163,10 [M+H]⁺)
- napięcie na kapilarze: 4000 V
- napięcie na detektorze: 1,6 kV
- temperatura linii desolvacyjnej: 275°C
- temperatura bloku grzewczego: 325°C
- natężenie przepływu gazu nebulizującego: 1,5 L/min (N₂)
- natężenie przepływu gazu osuszającego: 15 L/min (N₂)

ANALIZA CHROMATOGRAFICZNA NIKOTYNY W TYTONIU LUB W WYBRANYCH PRODUKTACH TYTONIOWYCH

Przed rozpoczęciem właściwej analizy badanej próbki należy wykonać analizę chromatograficzną roztworu kontrolnego nikotyny o stężeniu 50 ng/mL i porównać zgodność wyniku z krzywą wzorcową. Otrzymany wynik powinien mieścić się w zakresie stężenia teoretycznego $\pm 20\%$. W wypadku braku zgodności wyniku należy przygotować nowe roztwory wzorcowe nikotyny oraz sporządzić nową krzywą wzorcową. Jeśli roztwór kontrolny spełnia powyższe kryterium wykonać analizę próbki posługując się tą samą metodą chromatograficzną jak dla roztworów wzorcowych i mieszaniny kontrolnej.

C. ANALIZA ZAWARTOŚCI NIKOTYNY Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI CE

(Szczegóły techniczne wykonania analizy CE poda prowadzący przed jej wykonaniem)

SPORZĄDZENIE KRZYWEJ WZORCOWEJ

W celu sporządzenia krzywej wzorcowej przeprowadzić analizy CE roztworów wzorcowych nikotyny otrzymanych przez odpowiednie rozcieńczenie wodą roztworu wzorcowego nikotyny o stężeniu 1 mg/mL do następujących stężeń: 1 mg/mL (NIEROZCIEŃCZONY) 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL i 0,05 mg/mL. **Każdą próbkę wzorcową przygotować w objętości 50 μ L.** Na podstawie analizy pól powierzchni pików w otrzymanych elektroforegramach metodą regresji liniowej (wyznaczyć parametry a, b i R²) wykreślić krzywą wzorcową przedstawiającą zależność powierzchni pików od stężenia wzorca.

WARUNKI ANALIZY

- aparat do elektroforezy kapilarnej SCIEX PACE MDQ Plus
- kapilara szklana o wymiarach 30(20 cm do detektora)×50 μ m i.d.
- bufor separacyjny: 25 mM bufor fosforanowy, pH 2,5
- iniekcja próbki: ciśnieniowa, 0,5 psi przez 5s
- metoda separacji: stałe napięcie 20 kV
- detekcja przy długości fali $\lambda = 200$ nm
- czas analizy: 3 min
- polaryzacja elektrod: normalna (katoda (-) od strony detektora)

ANALIZA ELEKTROFORETYCZNA NIKOTYNY W TYTONIU LUB W WYBRANYCH PRODUKTACH TYTONIOWYCH

Przed rozpoczęciem właściwej analizy CE badanej próbki należy wykonać analizę CE roztworów wzorcowych nikotyny. Następnie w identycznych warunkach analizować dwukrotnie badaną próbkę. **Próbka musi być przefiltrowana przez filtr o średnicy porów**

0,22 μ m przed analizą!!! Otrzymany wynik powinien mieścić się w zakresie stężeń krzywej wzorcowej. Jeżeli tak nie jest należy rozcieńczyć badaną próbkę aby spełniała ona ten warunek i powtórzyć analizę.

D. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW KOŃCOWYCH

Na podstawie czasów retencji (chromatogramy LC-MS) oraz czasów migracji (elektroforegramy CE) zidentyfikować nikotynę w badanej próbce, a jej zawartość wyznaczyć na podstawie powierzchni pików, posługując się krzywymi wzorcowymi. Wyniki końcowe oznaczeń przedstawić w mg/g badanej próbki oraz w postaci procentowej zawartości nikotyny w badanej próbce z dokładnością do 0,1. Porównać wyniki otrzymane metodami LC-MS i CE – wskazać przyczyny ewentualnych rozbieżności w otrzymanych wynikach.

ZAKRES MATERIAŁU

Klasyfikacja, występowanie i właściwości alkaloidów, struktura i właściwości nikotyny, podstawowe wiadomości z zakresu wysokosprawnej chromatografii cieczowej, spektrometrii mas i elektroforezy kapilarnej (w tym podstawowe pojęcia, podstawy fizyczne procesu rozdziału, metoda krzywej wzorcowej)

LITERATURA

PODSTAWOWA:

1. Kołodziejczyk A „Naturalne związki organiczne”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2004).
2. Koliński A, Marciniak P, Adamski Z, Rosiński G „Alkaloidy – naturalne substancje kardioaktywne”, *Kosmos*, 65(2): 247-256 (2015).
3. Sobkowski R, Lesicki A „Wchłanianie, przemiany metaboliczne i wydzielanie nikotyny u człowieka”, *Postępy Biochemii*, 59(1): 33-44 (2013).
4. Witkiewicz W „Podstawy chromatografii”, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa (2000).
5. Kubica P „Chromatografia oddziaływań hydrofilowych sprzężona ze spektrometrią mas, jako alternatywne do chromatografii w odwróconym układzie faz rozwiązanie w celu rozdzielania substancji polarnych i średniopolarnych”, Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska (2016). Adres www: http://pbc.gda.pl/Content/58180/phd_kubica_pawel.pdf

UZUPEŁNIAJĄCA:

6. Vieirat CA, de Paivar SAA, Funai MNS, Bergamaschi MM, Queiroz RH, Giglio JR “Quantification of nicotine in commercial brand cigarettes”, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 38(5): 330-334 (2010).
7. Vlase L, Filip L, Mindruta I, Leucuta SE “Determination of nicotine from tobacco by LC-MS-MS”, *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Physica*, L, 4b: 19-24 (2005).
8. Taujenis L, Olsauskaite V, Padaruskas A “Determination of nicotine and three minor alkaloids in tobacco by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry”, *Acta Chromatographica*, 27(2): 373-385 (2015).
9. Massadeh AM, Gharaibeh AA, Omar 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”, *Journal of Chromatographic Science*, 47: 170-177 (2009).