

# Optimizacija metode za kvantifikaciju nikotina u duhanu plinskom kromatografijom sa spektrometrijom masa

---

Marić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:806539>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marko Marić**

**Optimizacija metode za kvantifikaciju  
nikotina u duhanu plinskom kromatografijom  
sa spektrometrijom masa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitička kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, Ministarstva unutarnjih poslova (MUP) Republike Hrvatske pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Jablan uz komentorstvo dr.sc. Ivane Bačić, dipl. ing.

*Neizmjereno hvala mojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Jasni Jablan i dr.sc. Ivani Bačić, dipl.ing. Iako je moje ime navedeno u naslovu ovog diplomskog rada, smatram ga svojim samo trećinu (ako i toliko) kada se sjetim koliko sam pomoć od mentorica dobivao tijekom cijelog procesa istraživanja i pisanja ovog diplomskog rada.*

*Velika zahvala ide i Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, MUP-a RH na omogućenom prostoru i materijalima za odrađivanje eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada. Ovdje posebno izdvajam dr.sc. Hrvoja Sarajliju čije su dosjetke i kreativnost bile ključne u trenucima „a što sad?“ i čije je znanje ubrzalo i olakšalo cijeli proces pisanja ovog diplomskog rada.*

*Slijedi zahvala mojim najbližima. To su prije svega moji roditelji, otac Tomislav i majka Natalija, najbolja sestra Marta i najdraža zaručnica Katarina. Roditeljima hvala na svakoj pomoći i podršci koju sam imao tijekom studija. Sestri hvala što je sestra, a zaručnici jer me na ovom ispunjenom i izazovnom putu pratila svaki dan i što smo tijekom svega rasli jedno uz drugo.*

*Uz njih veliko hvala ide i mojoj baki Miri, didi Ivici, stričevima Jozi i Niki, ujaku Anti s obitelji, a posebno najdražem malom Lovri.*

*Svim mojim prijateljima, kumovima i kumićima hvala što su ovaj put učinili jednostavnijim i zabavnijim.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Duhan.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Kemijski sastav duhana i duhanskog dima.....	1
1.1.2. Povijest duhana u Republici Hrvatskoj.....	5
1.1.3. Statistički podaci vezani uz konzumaciju duhana.....	6
<b>1.2. Nikotin.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Farmakokinetika nikotina.....	7
1.2.2. Farmakologija nikotina.....	8
1.2.3. Ciklus nikotinske ovisnosti.....	9
1.2.4. Terapija nikotinske ovisnosti.....	11
<b>1.3. Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS).....</b>	<b>11</b>
1.3.1. Kvantitativna analiza i metoda internog standarda.....	14
<b>1.4. Validacija analitičke metode.....</b>	<b>14</b>
1.4.1. Karakteristike parametara validacije.....	15
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>18</b>
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Laboratorijski pribor i posuđe.....	18
3.1.3. Radni instrumenti.....	19
3.1.4. Uzorci.....	21
<b>3.2. Metode.....</b>	<b>24</b>
3.2.1. Priprema otopina.....	24
3.2.1.1. Priprema standardne otopine kofeina.....	24
3.2.1.2. Priprema standardnih otopina nikotina.....	24
3.2.2. Priprema uzoraka.....	25
3.2.2.1. Eksperimentalni dizajn.....	25
3.2.2.2. Priprema uzoraka za optimizaciju metode.....	26
3.2.2.3. Priprema uzoraka za analizu optimiziranom metodom.....	27
3.2.3. Postupak određivanja nikotina u duhanu GC-MS metodom.....	28
3.2.3.1. Optimizacija GC-MS uvjeta.....	28

3.2.3.2. Metoda analize.....	32
<b>3.3. Statistička obrada podataka.....</b>	<b>34</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Optimizacija metode.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Eksperimentalni dizajn.....	35
<b>4.2. Validacija analitičke metode.....</b>	<b>38</b>
4.2.1. Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti.....	38
4.2.2. Selektivnost.....	39
4.2.3. Kalibracijska krivulja.....	40
4.2.4. Ponovljivost mjerenja površine i koncentracije.....	42
4.2.5. Ponovljivost pripreme uzorka.....	43
4.2.6. Međupreciznost (intermedijarna preciznost).....	44
4.2.7. Točnost.....	45
4.2.8. Granica određivanja.....	47
<b>4.3. Određivanje udjela nikotina u realnim uzorcima duhana.....</b>	<b>47</b>
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>51</b>
<b>7. SAŽETAK/ SUMMARY.....</b>	<b>54</b>
<b>8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

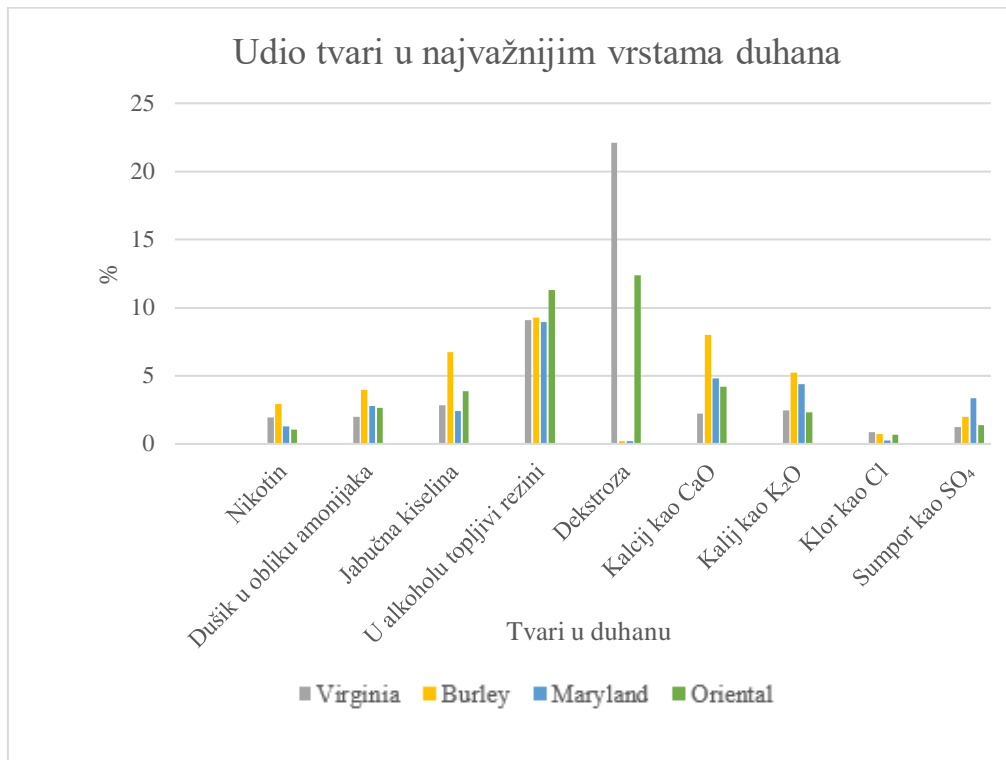
## 1.1 Duhan

Duhan kao biljka odnosi se na bilo koju vrstu roda *Nicotiana* porodice *Solanaceae* kojoj također pripadaju krumpir, rajčica te vrtne paprike. Rodu *Nicotiana* pripada oko sedamdeset vrsta duhana, no najznačajniji u smislu proizvodnje i konzumacije je *Nicotiana tabacum*. Ova vrsta se ne pojavljuje prirodno, već je produkt ljudske kultivacije kao hibrid vrsta *Nicotiana sylvestris* i *Nicotiana tomentosiformis*. Duhan može rasti u različitim uvjetima temperature i vlage te se stoga može uzgajati na svim kontinentima osim Antarktike. Iako je primjena duhana prvenstveno značajna u svrhu ugone i kao sredstvo ovisnosti, kroz povijest je bila važna i kao pokušaj terapijskog učinka kod određenih bolesti. Tako je prema Jean Nicotu u 16. stoljeću duhan smatran kao lijek za zubobolju i parazite. Način primjene duhana najčešći je u obliku pušenja cigareta, cigara i nargila, dok se najstarijim načinom smatra žvakanje duhana zabilježeno još kod Indijanaca (Hanafin i Clancy, 2015). Duhan se može podijeliti na nekoliko kategorija. Jedna od njih je na svijetle i tamne i to prema boji suhog lista duhana. Sljedeća kategorija je prema kemijskoj reakciji dima kojoj pripadaju, kiseli duhani značajni su po većem udjelu ugljikohidrata dok alkalne duhane karakterizira veći udio nikotina, proteina i dušičnih tvari. Također, dijele se i na aromatične koji izgaranjem daju posebne mirisne i okusne arome te na nearomatične. Najznačajnija podjela je prema vrsti sušenja gdje pripadaju *flue cured* (duhan sušen toplim zrakom u sušionicama) od kojih je najvažniji duhan tip Virginia, *air cured* (duhan sušen na zraku) od kojih su najpoznatiji Burley i Maryland, *sun cured* (duhan sušen na suncu) te *fire cured* (duhan sušen iznad otvorene vatre). Posebnu vrstu duhana čini i Oriental, poznatiji kao turski duhan, značajan po svojim specifičnim aromama ([www.hrvatskiduhani.hr](http://www.hrvatskiduhani.hr)).

### 1.1.1 Kemijski sastav duhana i duhanskog dima

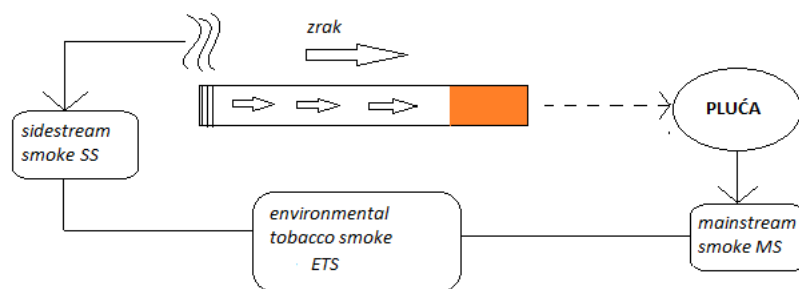
Danas je poznato oko 7000 različitih tvari prisutnih u duhanu i duhanskom dimu (Dusautoir i sur., 2021). Vrsta i udio tvari koje se nalaze u duhanu ovise o samoj vrsti duhana. Neke od najznačajnijih tvari u duhanu su nikotin, dušik u obliku amonijaka, jabučna kiselina, u alkoholu topljivi rezini (eksudati biljaka očvršćeni na zraku (Legenheim, 1990)), sirova vlakna, šećer dekstroza te brojni metali i nemetali u anorganskom obliku kao što su kalcij, kalij, klor, sumpor. Duhan Burley predvodi u većini udjela prisutnih tvari u odnosu na vrste Virginia,

Maryland i Oriental koji su najzastupljeniji tipovi duhana u upotrebi, što se može jasno vidjeti na Slici 1 (Leffingwell i sur., 1999).



Slika 1. Udio tvari u najvažnijim vrstama duhana (podaci preuzeti od Leffingwell i sur., 1999).

Tijekom pušenja duhana, točnije njegovim gorenjem nastaje duhanski dim koji se dijeli na „*mainstream smoke*“ (MS) koji podrazumijeva dim koji osoba stvara udisanjem tijekom pušenja duhana te na „*sidestream smoke*“ (SS) koji podrazumijeva dim nastao između udisanja tijekom pušenja duhana. U obzir se uzima još jedna vrsta duhanskog dima, a to je „*environmental tobacco smoke*“ (ETS) koji čini zbroj „*sidestream smoke*-a“ i dijela „*mainstream smoke*-a“ nastao izdisanjem duhanskog dima tijekom pušenja duhana što jasno prikazuje Slika 2 (Lisforth, 1989).



Slika 2. Shematski prikaz nastajanja duhanskog dima.

Iako duhanski dim čini nekoliko tisuća tvari, postoje one koje su prisutne u većim količinama. Dijele se na glavne i sporedne tvari, ovisno o njihovim količinama u samom dimu, što se shematski vidi u Tablici 1. Glavne tvari duhanskog dima čine katran koji je smjesa različitih organskih čvrstih čestica, ugljikov monoksid, nikotin, dušikovi oksidi te hlapljivi ugljikovodici od kojih su najznačajniji nezasićeni alifatski ugljikovodici s naglaskom na alkene. Alkeni su od posebnog značaja jer njihovim metabolizmom u organizmu nastaju epoksidi koji su vrlo reaktivni spojevi s potencijalnim kancerogenim djelovanjem. Alkeni koji su u većim količinama prisutni u duhanskom dimu su eten, propen, 1,3-butadien te izopren (2-metil-1,3-butadien). Sporedne tvari čine aromatski ugljikovodici kao što su fluoranten, benzo[a]piren, o-toluidin te kinolin. Uz aromatske ugljikovodike značajni su i *N*-nitrozamini te radioaktivni izotopi i to  $Po^{210}$ . Tvari duhanskog dima dobro su istražene u vidu njihovog štetnog učinka na ljudski organizam. Tako su policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) kao dio duhanskog dima pokazali štetan učinak na pluća i bronhije, *N*-nitrozamini na mokraćni mjehur, dok su alkeni pokazali multipotentnost te mogućnost štetnog učinka na brojne organe (Lisfroth, 1989).

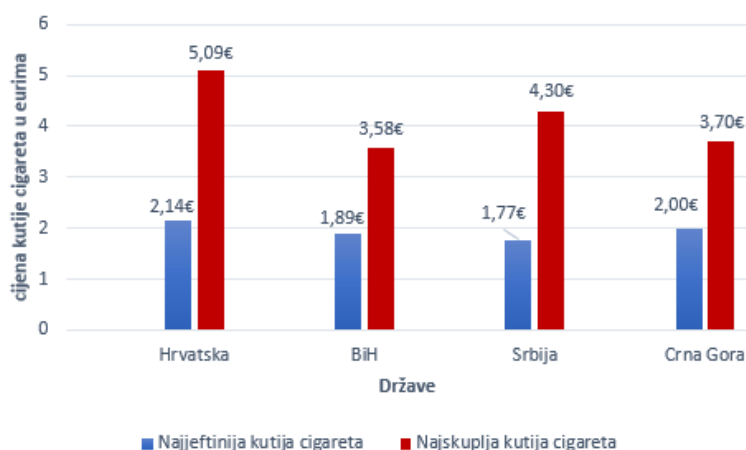


Tablica 1. Količina tvari u duhanskom dimu.

Tvari u duhanskom dimu	Sidestream		Mainstream	
<b>Glavne tvari</b>	katran	24,1 mg		11,4 mg
	ugljikov monoksid	53 mg		12 mg
	nikotin	4,1 mg		0,8 mg
	dušikov oksid	2-3 mg		0,2-0,5 mg
	<b>Hlapljivi ugljikovodici</b>			
	eten	1,2 mg		0,24 mg
	propen	1,3 mg		0,18 mg
	1,3-butadien	0,4 mg		0,03 mg
	izopren	3,1 mg		0,70 mg
	<b>Aromatski ugljikovodici</b>			
	<b>Sporedne tvari</b>	fluoranten	1,3 µg	
	benzo[a]piren	0,2 µg		0,04 µg
	o-toluidin	3 µg		0,16 µg
	kinolin	18 µg		1,7 µg
	<b>N-nitrozamini</b>			
	nitrozodimetilamin	0,2-1 µg		0,01-0,04 µg
	nitrozonornikotin	0,15-1,7 µg		0,1-1 µg
	<b>Radioaktivni izotopi</b>			
	Po <sup>210</sup>	0,004 Bq		0,003 Bq

## 1.1.2 Povijest duhana u Republici Hrvatskoj

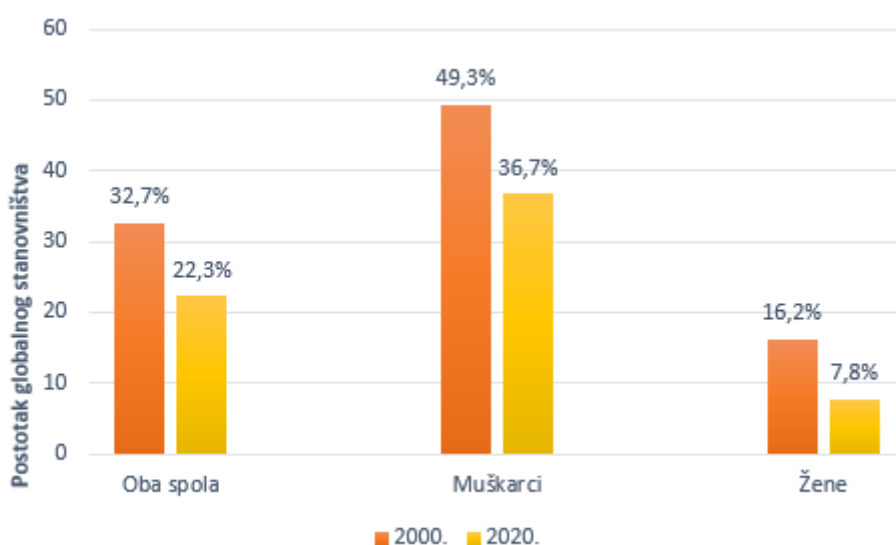
Najraniji podaci o pojavi duhana na području Republike Hrvatske datiraju još iz 1632. godine i to na području Dubrovačke Republike u vidu njegovog uvoza iz Ancone. Spominje se također i 1648. u odluci Senata u smislu određivanja carina na njegov uvoz u Dubrovačku Republiku. Krajem 17. stoljeća, nakon protjerivanja Osmanlija iz područja Slavonije, započinje uzgoj duhana u Republici Hrvatskoj. Prva mjesta gdje se duhan počeo uzgajati bila su Požega, Virovitica i Baranja. U radu „Povijesni i zemljopisni opis Kraljevine Slavonije i vojvodstva Srijema“ iz 1778. godine, njemački putopisac Taube izrazitu hvalu daje požeškom duhanu za kojeg smatra da je podjednako kvalitetan u odnosu na turski duhan. Proizvodnja duhana kroz čitavu hrvatsku povijest imala je izuzetnu važnost čemu svjedoče i plakati iz fundusa Muzeja grada Zagreba koji kažu „Sadi duhan, imat ćeš žito i sol“ i također „Više duhana/više novca“. Današnja proizvodnja duhana uglavnom je prisutna na području Požeške kotline, istočne Slavonije te Podravine, a najčešća je proizvodnja vrsta Virginia i Burley (Dundović, 2019). Posebna važnost konzumacije duhana, točnije konzumacije cigareta kao najčešćih oblika korištenja, ogleda se i u njenoj cijeni. Tako je u Republici Hrvatskoj cijena najjeftinije kutije cigareta (u eurima) 2,14 eura, dok je najskuplja kutija cigareta 5,09 eura. Uspoređujući cijene s određenim susjednim državama, one su značajno veće i u vidu najjeftinijih, ali i najskupljih kutija cigareta. Tako za primjer u Bosni i Hercegovini najjeftinija kutija cigareta iznosi 1,89 eura, u Srbiji 1,77 eura, a u Crnoj Gori 2,00 eura. S druge strane, najskuplja kutija cigareta u Bosni i Hercegovini iznosi 3,58 eura, u Srbiji 4,30 eura, a u Crnoj Gori 3,70 eura (Slika 3) (Zubović i sur., 2019).



Slika 3. Cijene kutije cigareta u eurima na području Hrvatske, BiH, Srbije i Crne Gore (podaci preuzeti od Zubović i sur., 2019).

### 1.1.3 Statistički podaci vezani uz konzumaciju duhana

Početak 2000. godine konzumacija duhana u oba spola starijih od 15 godina, bila je gotovo trećina globalne populacije (32,7%), dok se 2020. taj postotak smanjio do manje od četvrtine populacije (22,3%) (Slika 4). Gledajući isključivo muškarce starije od 15 godina 2000. godine, duhan je konzumirala gotovo polovica muške populacije (49,3%), dok se do 2020. godine taj postotak smanjio na malo više od trećine muške populacije (36,7%). Kod žena starijih od 15 godina te su vrijednosti značajno manje, tako je 2000. godine duhan konzumirala otprilike 1 od 6 žena (16,2%), a 2020. godine otprilike 1 od 13 žena (7,8%) (Commar i sur., 2021).

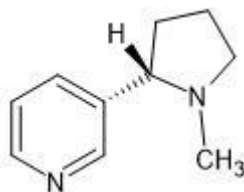


Slika 4. Postotak globalnog stanovništva koji je konzumirao duhan tijekom 2000. i 2020. godine (podaci preuzeti od Commar i sur., 2021).

## 1.2 Nikotin

Nikotin, alkaloid iz duhana, smatra se glavnim razlogom konzumacije duhana kod ljudi zbog stvaranja ovisnosti u ljudskom organizmu. Značajan je i kao potencijalna terapija raznih bolesti kao što su ulcerativni kolitis, Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest itd. Terapeutski je važan i u obliku žvakaćih guma, transdermalnog pripravka te nazalnog spreja kao pomoć kod apstinencijske krize nastale prestankom konzumacije duhana. Djeluje na nikotinske acetilkolinske receptore (nAChR). Po strukturi je tercijarni amin s piridinskim i pirolidinskim prstenom (Slika 5). Fiziološki je značajan (S)-nikotin koji se stereoselektivno veže na nAChR

dok (R)-nikotin koji u maloj količini nastaje racemizacijom tijekom gorenja duhana ima slab učinak na nAChR, međutim važan je u farmakološkim studijama (Benowitz, 1996<sup>c</sup>, 1986<sup>a</sup>).

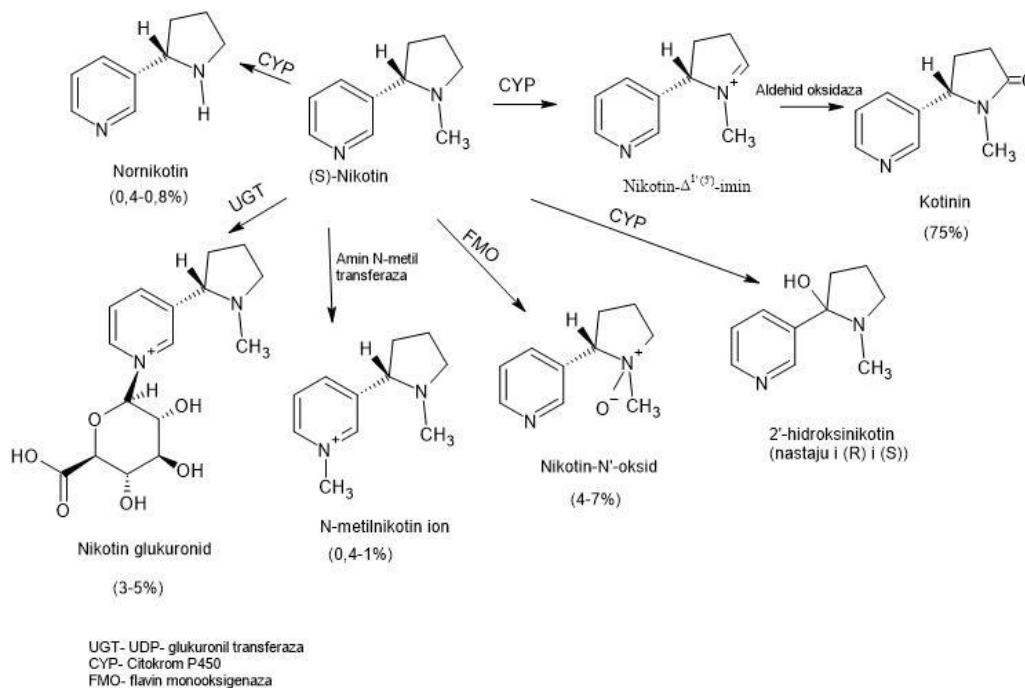


Slika 5. Struktura (S)-nikotina

### 1.2.1 Farmakokinetika nikotina

Apsorpcija nikotina kroz membrane organizma ovisi o pH. Razlog tomu je ioniziranost samog nikotina koji je slaba baza te će u kiseloj sredini biti u ioniziranom obliku i teže će prolaziti kroz membrane, dok će u lužnatoj sredini biti neioniziran i kao takav će moći prolaziti membrane organizma. Apsorpcija nikotina u plućima neovisna je o pH. Iz tog razloga se cigarete puše tako da se udišu u pluća jer je pH dima cigareta kiseo (pH 5,5) i nikotin je u ioniziranom obliku te je apsorpcija u usnoj šupljini minimalna. S druge strane, dim cigara primjerice kubanki i cigarilosa je lužnat (pH 8,5) te nikotin, koji je pri ovim uvjetima nije ioniziran, lako prolazi kroz membrane usne šupljine. Stoga se one konzumiraju na način da se dim cigara zadržava u usnoj šupljini gdje se nikotin apsorbira te se nakon nekoliko trenutaka ispuhuje. Tijekom uvlačenja dima duhana, nikotin je nošen na česticama katrana veličine od 0,1 do 0,4  $\mu\text{m}$  (Benowitz, 1986). Apsorpcija nikotina moguća je i kroz kožu gdje je zabilježen slučaj trovanja nakon izlaganja pesticidima bogatih nikotinom. Distribucija nikotina u cirkulaciju primarno je preko plućne cirkulacije. Brzinu dolaska nikotina u mozak pokazuje i primjer da je vrijeme između udisanja dima i dolaska nikotina u mozak puno kraće nego u slučaju intravenske primjene. Metabolizam nikotina istraživani su desetljećima te su otkriveni brojni metaboliti, kao i enzimi koji u metabolizmu sudjeluju (Slika 6). Najznačajniji primarni metabolit nikotina (70-75%) je kotinin nastao prvotnim djelovanjem citokroma P450 enzima (CYP) do nikotin- $\Delta^{1'(5')}$ -imin iona te zatim djelovanjem enzima aldehyd dehidrogenaze do kotinina koji je s nikotin- $\Delta^{1'(5')}$ -iminom u ravnoteži. CYP enzimi također sudjeluju i u metabolizmu nikotina pri nastajanju nornikotina te 2'-hidroksinikotina. Od ostalih primarnih metabolita bitno je navesti i nikotin-*N'*-oksid nastao djelovanjem enzima flavin monooksigenaze 3 (FMO3), zatim *N*-metilnikotin ion nastao djelovanjem enzima amin *N*-

metiltransferaze i u konačnici nikotin glukuronid nastao djelovanjem enzima UDP-glukuronozil transferaze (UGT). Iako se nikotin primarno metabolizira u jetri, mali udio metabolizma odvija se i u plućima te bubrežima. Nikotin se primarno eliminira renalno što ovisi o pH urina te urinarnom protoku, zbog čega renalna eliminacija varira u udjelu ukupne eliminacije (2-35%). Poluvrijeme života nikotina je prosječno 2 sata, međutim individualno može varirati od 1-4 sata (Benowitz, 1996<sup>c</sup>, 1986<sup>a</sup>; Hukkanen i sur., 2005).

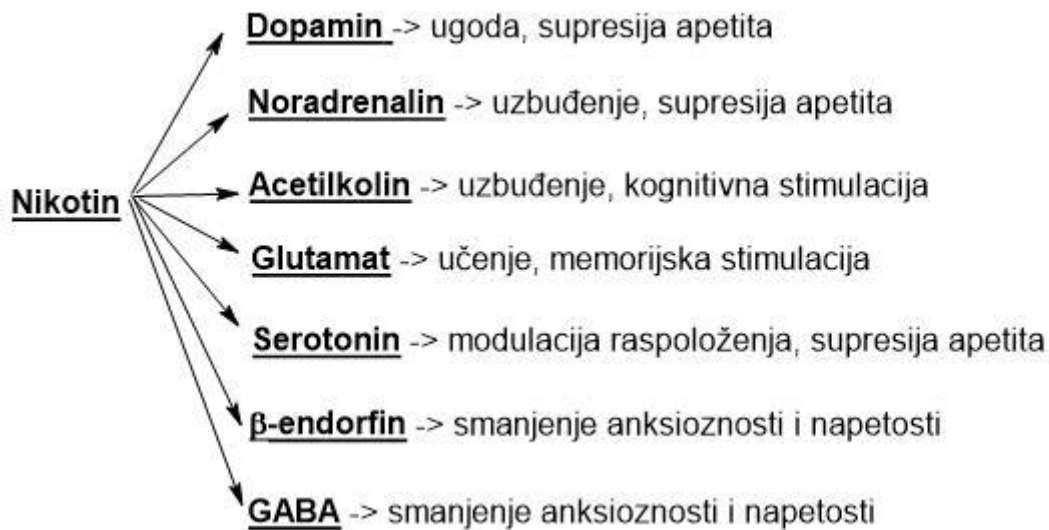


Slika 6. Metabolizam (S)-nikotina u organizmu s najvažnijim metaboličkim produktima (preuzeto i prilagođeno od Hukkanen i sur., 2005).

## 1.2.2 Farmakologija nikotina

Nikotin djeluje preko nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR). Spomenuti receptori građeni su od 5 podjedinica među kojima je prisutna raznolikost temeljem izoformi podjedinica. Tako postoji 9 izoformi  $\alpha$ -podjedinica ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) te 3 izoforme  $\beta$ -podjedinica ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ). U najvećoj mjeri prisutni su receptori s  $\alpha 4$  te  $\beta 2$  podjedinicama gdje je  $\alpha 4$  podjedinica značajna zbog osjetljivosti vezanja nikotina, a  $\beta 2$  podjedinica zbog poticanja otpuštanja dopamina te posljedičnih učinaka na ponašanje. Od ostalih tipova nAChR značajni su oni s  $\alpha 3$  te  $\beta 4$  podjedinicama jer se smatra da su ti receptori zaslužni za kardiovaskularni učinak

nikotina. Aktivacija nAChR nikotinom temelji se na otpuštanju različitih neurotransmitera koji zatim ispoljavaju svoje učinke mijenjajući neurokemiju pušača što se odražava na njegovo ponašanje. Neurotransmiteri koji se otpuštaju aktivacijom nikotinskih receptora su dopamin, noradrenalin, acetilkolin, serotonin,  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA), glutamat te endorfini čiji su učinci prikazani na Slici 7 (Benowitz, 2008<sup>b</sup>).

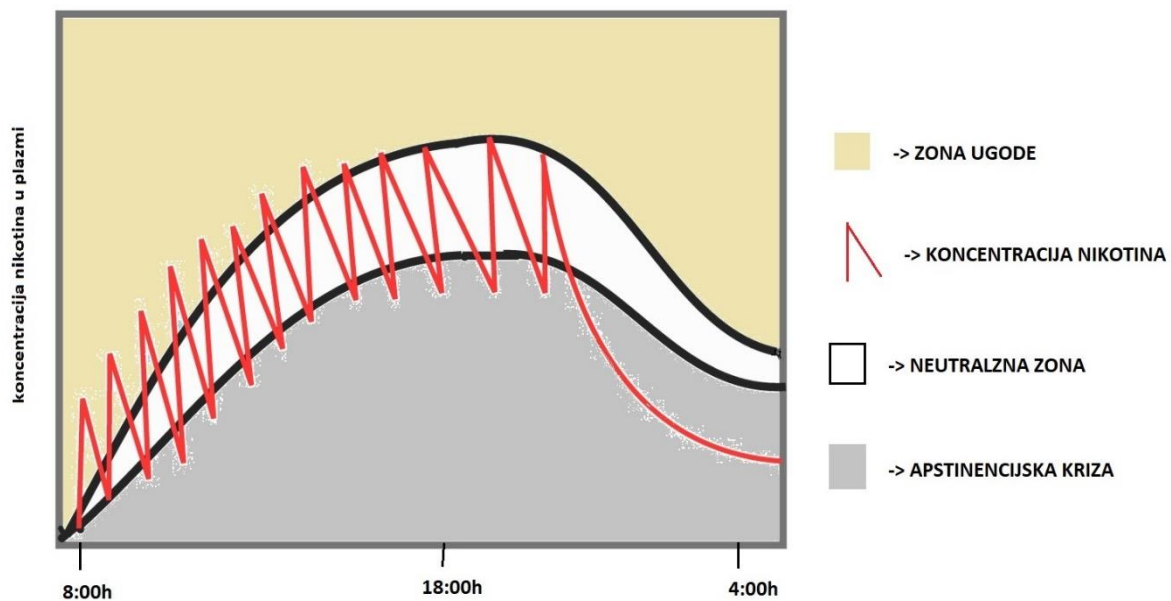


*Slika 7. Učinci neurotransmitera otpuštenih aktivacijom nikotinskih receptora (preuzeto i prilagođeno od Benowitz, 2008<sup>b</sup>).*

### 1.2.3 Ciklus nikotinske ovisnosti

Ciklus nikotinske ovisnosti, shematski prikazan na Slici 8, matematički je model dr. Shi Jun-a temeljen na farmakokinetičkom i farmakodinamičkom razvoju nikotinske tolerancije te se odvija svakodnevno kod pušača cigareta. Model se temelji na utjecaju nikotina na pušače u vidu tri parametra. Prvi među njima je „ugoda“ (označeno svijetlo smeđom bojom) koja se odnosi na individualno pozitivne učinke u smislu zadovoljstva i emocionalno pozitivnog odgovora, zatim slijedi parametar „neutralne zone“ (označeno bijelom bojom) koja se može okarakterizirati stanjem bez „ugode“, ali i bez „apstinencijske krize“. Treći parametar je već spomenuta „apstinencijska kriza“ (označeno sivom bojom) koja se objašnjava željom pušača (ovisnika o nikotinu) za pušenjem, praćeno blagim osjećajem nelagode. Shematski prikaz ciklusa nikotinske ovisnosti (Slika 8) ne uzima u obzir brojčane vrijednosti doze nikotina u nekoj mjernoj jedinici, već samo razliku u koncentraciji nikotina u organizma nakon svake

popušene cigarete predstavljene na osi y u odnosu na vrijeme (broj sati u danu) predstavljene na osi x. Na shematskom prikazu jasno se vidi da nikotinski unos tijekom prvih nekoliko popušanih cigareta (počevši od 8:00 sati) stavlja organizam u stanje „ugode“ te je „neutralna zona“ jako uska što karakterizira manju toleranciju organizma na nikotinske učinke. S porastom broja cigareta tijekom dana „neutralna zona“ postaje šira odnosno povećava se tolerancija organizma na nikotin. Širenje „neutralne zone“ događa se nauštrb osjećaja „ugode“ uz istovremeno povećanje „apstinencijske krize“ kada razine nikotina padnu. Tijekom spavanja organizam zbog ne unosa nikotina odlazi u područje „apstinencijske krize“ te se prostor „neutralne zone“ sužava što karakterizira ponovnu smanjenu toleranciju na nikotin. Ovaj prikaz objašnjava zašto su ljudima više „ugodne“ cigarete popušene ujutro te zašto već pri kraj dana, iako „ugode“ nema, i dalje pale cigarete, što je objašnjeno odlaskom organizma u područje „apstinencijske krize“ (Benowitz, 2008<sup>b</sup>).



Slika 8. Shematski prikaz ciklusa nikotinske ovisnosti tijekom 24h (preuzeto i prilagođeno od Benowitz, 2008<sup>b</sup>).

#### **1.2.4 Terapija nikotinske ovisnosti**

Terapija nikotinske ovisnosti prisutna je u brojnim oblicima. Međutim, sam mehanizam liječenja nikotinske ovisnosti temelji se uglavnom na nikotinskoj nadomjesnoj terapiji (engl. *Nicotine Replacement Therapy, NRT*) te na određenim terapeutima čija primarna uloga nije bila terapija nikotinske ovisnosti već je ona primijećena tijekom korištenja spomenutih terapeutika. NRT se temelji na unosu nikotina u organizam ovisne osobe u svrhu smanjenja apstinencijske krize zbog prestanka pušenja te pozitivnom odgovoru osobe koja ga koristi. Postoji nekoliko oblika u kojima se nikotin može unijeti, gdje najveći pozitivan odgovor daje nazalni sprej nikotina i to upravo zbog najbrže apsorpcije nikotina u organizam te trenutnom olakšavanju apstinencijske krize, slično onome kod samog pušenja cigareta. Nešto slabiji pozitivan odgovor daje unos nikotina u obliku žvakaće gume, inhalera te pastila. Prednost ovih oblika i razlog relativno velikog pozitivnog odgovora na terapiju je i u tome što si osoba sama dozira nikotin što uvelike olakšava pacijentovu adherenciju na terapiju. Najslabiji pozitivan odgovor na terapiju imaju transdermalni flasteri nikotina, upravo zbog toga što je doziranje konstantno tijekom cijeloga dana te se u slučaju povećanog osjećaja apstinencijske krize ne može posegnuti za trenutnim olakšanjem. Isto tako u slučaju NRT važno je napomenuti da zbog unosa nikotina u navedenim oblicima samo pušenje cigareta više nije toliko ugodno jer dolazi do desenzitizacije nikotinskih receptora te se osoba i iz tog razloga ne želi vratiti pušenju cigareta. Od ostalih prisutnih terapija nikotinske ovisnosti bitno je navesti i bupropion koji je prvotno korišten kao antidepresiv. Tijekom njegove primjene na pacijentima s depresijom uočeno je smanjenje apstinencijske krize zbog izostanka nikotina. Tako se bupropion počeo koristiti i kao lijek za terapiju nikotinske ovisnosti. Mehanizam djelovanja je povećanje razine dopamina i noradrenalina u mozgu što utječe na smanjenje depresije, međutim isto tako oponaša učinke nikotina izlučivanjem navedenih neurotransmitera što smanjuje potrebu za njegovim unosom i smanjenom željom za pušenjem cigareta (Benowitz, 2009<sup>d</sup>).

### **1.3 Plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS)**

Plinska kromatografija u kombinaciji sa spektrometrijom masa (GC-MS) je analitička tehnika koja povezuje značajke visokoučinkovite metode odvajanja složenih smjesa organskih spojeva (GC) s visoko osjetljivom i pouzdanom metodom identifikacije i kvantifikacije (MS) odvojenih komponenata. Raspon primjene GC-MS tehnike je širok i smatra se „zlatnim



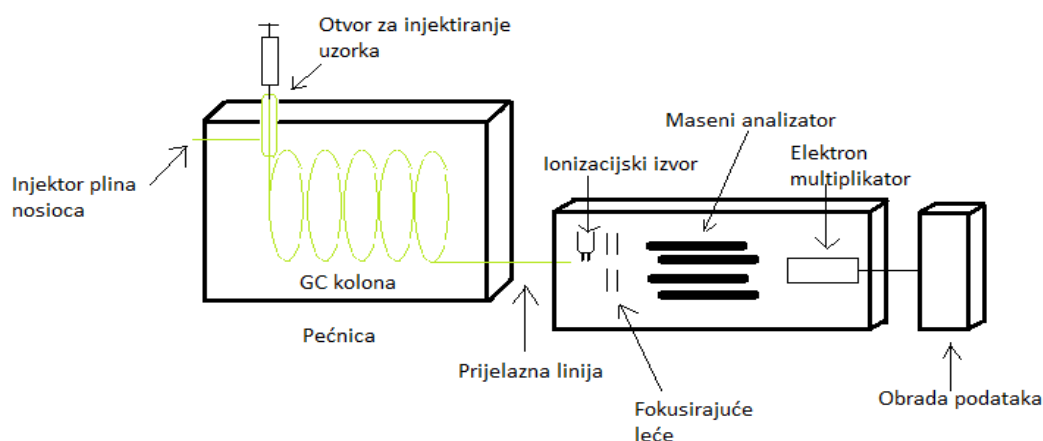
standardom“ u području analize droga, lijekova, praćenja onečišćenja okoliša, u forenzici, agronomiji, petrokemiji odnosno u svim segmentima gdje je potrebna identifikacija nepoznatih uzoraka (Žvorc i sur., 2021).

Plinska kromatografija temelji se na različitom afinitetu analita prema stacionarnoj fazi kromatografske kolone u kojoj se odvajanje komponenti smjese odvija.

Postupak odvajanja započinje unošenjem tekućeg ili plinovitog uzorka u plinski kromatograf putem sustava za ubrizgavanje (injektora) u kojem se tekući uzorak zagrijavanjem prevodi u plinovito stanje i pomoću plina nosioca uvodi u kromatografsku kolonu koja se nalazi u termostatiranoj pećnici. Kao plin nosioci najčešće se koristi helij, ali to mogu biti i drugi inertni plinovi poput dušika, vodika ili argona. Jedan od osnovnih parametara za učinkovito odvajanje komponenti smjese je odabir kromatografske kolone. Za plinsku kromatografiju dostupne su dvije osnovne vrste kolona, punjene i kapilarne. Kod punjenih kolona adsorbens ili tekuća nepokretna faza ispunjavaju kolonu, dok kod češće korištenih kapilarnih kolona stacionarna faza samo u tankom sloju prekriva njezinu unutrašnju stjenku. Odabrana stacionarna faza mora zadovoljavati određene kriterije, pa bi tako trebala biti selektivna za sve komponente smjese, kemijski inertna i toplinski postojana u širokom temperaturnom rasponu.

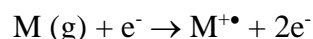
Afinitet komponenti prema stacionarnoj fazi najviše ovisi o vrelištu i polarnosti analita. Stoga će svaki spoj u uzorku eluirati iz kolone u različitim vremenima koje se naziva vrijeme zadržavanja (engl. retention time,  $t_R$ ). Na vrijeme zadržavanja odnosno brzinu eluiranja značajno utječu polarnost kolone, temperaturni režim pećnice te brzina protoka plina nosioca kroz kolonu. Usklađivanjem ovih parametara može se poboljšati selektivnost kromatografskog odjeljivanja čak i u slučajevima kada su analiti strukturno slični i imaju bliska vrelišta. Temperaturni režim zagrijavanja kolone obično se određuje eksperimentalno. Postoje dva načina zagrijavanja: izotermni (konstantna temperatura pećnice tijekom analize) i gradijentni tijekom kojega se temperatura u pećnici postupno povećava tijekom zadanog vremenskog perioda tako da se analiti odvajaju različitim brzinama.

Nakon odjeljivanja u plinskom kromatografu odvojene komponentne odlaze u spektrometar masa koji se sastoji od tri osnovna elementa: ionizacijske komore (ionski izvor), kvadrupolnog analizatora masa te detektora koji pojačava i bilježi nastali električni signal (Slika 9).

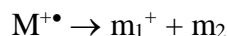
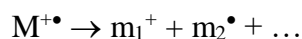


Slika 9. Skicirani prikaz GC-MS sustava (preuzeto i prilagođeno od Žvorc i sur., 2021).

Ionizacija elektronima (engl. *Electron Impact, EI*) je najčešća tehnika stvaranja nabijenih molekula ili kationskih radikala poznatih kao molekulski ion ( $M^{+\bullet}$ ), koja se odvija u ionskom izvoru.



Kontinuirano bombardiranje elektronima uzrokuje dodatno fragmentiranje molekulskog iona stvarajući različite ionske fragmente.



Svi nastali ionizirani fragmenti se u analizatoru masa odjeljuju u vremenu i prostoru temeljem njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) te detektiraju razmjerno njihovoj zastupljenosti.

GC-MS podaci mogu se prikupljati u skenirajućem (engl. *scan*) i ion selektivnom načinu rada (engl. *Selected Ion Monitoring, SIM*). Skenirajući način rada omogućava širok raspon detekcije ionskih fragmenata u zadanom rasponu  $m/z$  omjera i rezultira ukupnim ionskim kromatogramom (engl. *Total Ion Chromatogram, TIC*), dok se u selektivnom načinu rada detektiraju samo ionski fragmenti prethodno definiranog  $m/z$  omjera. (Žvorc i sur., 2021; Settle, 1998).

### 1.3.1 Kvantitativna analiza i metoda internog standarda

Kvalitativna analiza GC-MS tehnikom zasniva se na usporedbi vremena zadržavanja i spektra masa nepoznatog spoja s vremenom zadržavanja i spektrom masa standardnog uzorka ili poznatog spoja pohranjenog u certificiranim bazama podataka.

S druge strane, pristup kvantitativnoj analizi je nešto složeniji i podrazumijeva određivanje površine ili intenziteta pika koji predstavlja analit od interesa i obično izradu kalibracijske krivulje. Kvantitativna analiza u načinu rada ukupne ionske struje može se provesti na temelju ukupne površine pika, međutim ispravniji način je korištenje površine pika određenog iona koji se naziva kvantifikacijski ion. Za kvantifikaciju nekog analita mogu se primijeniti različite metode kalibracije poput metode standardnog dodatka, metode vanjskog standarda i metode internog standarda (IS), koja se zbog svojih prednosti i najčešće primjenjuje u plinskoj kromatografiji (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

Metoda internog standarda temelji se na usporedbi intenziteta signala analita koji se kvantificira s intenzitetom signala referentnog spoja koji se naziva interni standard. Ako se kao interni standard odabere molekula fizikalno-kemijskih svojstava bliskih analitu te ako se IS doda što je ranije mogućoj fazi pripreme uzorka, obje molekule će tijekom ekstrakcije, razrjeđivanja ili drugih koraka u postupcima kao i tijekom analize biti izložene istim pogreškama ili gubicima te će njihov omjer ostati nepromijenjen. Time se gubici i pogreške mogu zanemariti i postiže se maksimalna preciznost.

Metoda IS sastoji se od izrade kalibracijske krivulje iz standardnih uzoraka koji sadrže poznatu i uvijek istu količinu IS te rastuću količinu analita koji se mjeri. Time se dobiva matematički odnos između intenziteta signala analita i internog standarda ( $I_A/I_{IS}$ ) i koncentracije analita prisutnog u uzorku. Nakon izrade kalibracijske krivulje mjerenja se provode na nepoznatim uzorcima u koje je prije eksperimentalnog postupka dodana ista konstantna količina internog standarda (de Hoffmann i Stroobant, 2007).

## 1.4 Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se dokazuje prikladnost metode za predviđenu namjenu, čime se ujedno potvrđuje da će metoda sukladno propisanim uvjetima primjene dati pouzdane rezultate ispitivanja (Nigović, 2019). Validaciju može provoditi sam analitičar, ali i specifično nadležno tijelo (Skoog, 2013). Validacija metode je temelj kvalitete

bilo kojeg analitičkog mjerenja i neophodno ju je provesti kod novih metoda razvijenih u laboratoriju. Prvi korak u validaciji je odrediti jasnu svrhu metode jer o tome ovisi izbor radnih značajki ili parametara, kao i sam postupak provođena validacije. Sljedeći korak je određivanje prikladnih parametara kao što su selektivnost, linearnost, preciznost, međupreciznost, granica detekcije, granica kvantifikacije, točnost i robustnost, a za svaki parametar potrebno je postaviti i kriterije prihvatljivosti s kojima će se usporediti krajnji rezultati ([www.hmd.hr](http://www.hmd.hr)).

#### 1.4.1 Karakteristike parametara validacije

Selektivnost – sposobnost metode da u prisutnosti drugih tvari u uzorku točno odredi ciljani analit.

Linearnost – sposobnost metode da u određenom rasponu koncentracija da rezultate izravno proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Procjenjuje se matematički i grafički, a izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca ( $R$ ).

Prema smjernicama Međunarodnog vijeća za harmonizaciju (engl. *International Council for Harmonisation, ICH*) ([www.ich.org](http://www.ich.org)), ne moraju sve analitičke metode pokazivati linearnu ovisnost te u tom slučaju parametar linearnosti nije nužan. Nužno je naime prikazati o kakvoj se ovisnosti radi te ju izraziti pomoću koeficijenta determinacije ( $R^2$ ).

Preciznost – podudaranje rezultata ponovljenih mjerenja koji su dobiveni višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pri točno definiranim i jednakim uvjetima. Može se izraziti kao ponovljivost, intermedijarna preciznost (međupreciznost) te obnovljivost. Ponovljivost se odnosi na podudaranje rezultata dobivenih istom metodom u kratkom vremenskom periodu. Intermedijarna preciznost odnosi se na odstupanje rezultata pri različitim uvjetima (primjerice različiti analitičari) u istom laboratoriju. Obnovljivost je principijelno slična intermedijarnoj preciznosti, samo je razlika u tome što se kod obnovljivosti analiza provodi u različitim laboratorijima. Općenito se preciznost izražava pomoću standardne devijacije (SD) te relativne standardne devijacije (RSD).

Točnost – podudaranje srednjih vrijednosti rezultata sa stvarnim ili općeprihvaćenim referentnim vrijednostima, uobičajeno izražena kao analitički prinos (engl. *recovery*) (Nigović, 2019).

$$R = \frac{\bar{x}}{x} \times 100 \quad (1)$$

$\bar{x}$  – srednja izmjerena vrijednost analita u uzorku

$\hat{x}$  – stvarna vrijednost analita u uzorku

Granica dokazivanja – ili granica detekcije (engl. *limit of detection, LOD*) odnosi se na najmanju količinu analita koja se može dokazati sukladno uvjetima metode. Određuje se iz omjera signala i šuma koji mora biti najmanje 3:1 ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca.

Granica određivanja – ili granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification, LOQ*) odnosi se na najmanju količinu analita koja se može odrediti, a da su zadovoljeni postavljeni kriteriji preciznosti i točnosti. Određuje se iz omjera signala i šuma koji mora biti najmanje 10:1 ili iz standardnog odstupanja signala i nagiba kalibracijskog pravca ([www.hmd.hr](http://www.hmd.hr)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Konзумiranje duhanskih proizvoda u obliku cigareta, cigara, žvakanjem ili nekim drugim načinom, jedna je od najčešćih ovisnosti diljem svijeta. Komponenta duhanskih proizvoda koja uzrokuje ovisnost je nikotin. Nikotin sam po sebi i nije toliko štetan za organizam, međutim ostale komponente duhana i duhanskog dima itekako jesu i to u smislu kancerogenog djelovanja i izazivanja kardiovaskularnih te plućnih bolesti. Osim zdravstvenih posljedica, pušenje cigareta može uzrokovati i materijalnu štetu jer su odbačene neugašene cigarete česti uzrok slučajnih ali i namjerno izazvanih požara. Također, sa značajnim poskupljenjem duhanskih proizvoda sve je češća pojava trgovine industrijski neprerađenim duhanom, bez oznaka Ministarstva financija, što je način ostvarenja kaznenog djela nedozvoljene trgovine. Stoga, kvantitativno određivanje nikotina u određenom uzorku može imati važnost u takvim slučajevima, bilo da je potrebno utvrditi toksičnost uzorka, dokazati da se zaista radi o duhanu ili pak temeljem udjela nikotina utvrditi vrstu duhana. Iako je kvalitativna analiza duhana s ciljem utvrđivanja činjenice sadrži li određeni uzorak nikotin ili ne već ustaljena praksa, kvantitativno određivanje nikotina je, s druge strane, u manjoj mjeri razrađeno i primjenjivano.

Cilj ovog diplomskog rada bio je razviti i validirati brz, pouzdan i ekološki prihvatljiv način pripreme i kvantitativne analize nikotina u uzorcima duhana GC-MS tehnikom koji će se primjenjivati u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ Ministarstva unutarnjih poslova (MUP) RH.

U ovom istraživanju Box-Behnkenov dizajn je primijenjen za dizajn ekperimenta te za optimizaciju metode za kvantifikaciju nikotina. Tri parametra koja su promatrana kao esencijalni te koji su uzeti u obzir tijekom optimiziranja navedene metode bili su broj ekstrakcija duhana, ekstrakcijsko sredstvo te vrijeme soniciranja. Nakon što je metoda optimizirana odredila se količina nikotina u prikupljenim uzorcima duhana pomoću GC-MS-a koja je validirana provjerom nekoliko parametara validacije. Navedeni provjeravani parametri validacije bili su selektivnost, točnost, koeficijent kalibracije i determinacije kalibracijske krivulje, granica kvantifikacije, preciznost izražena kroz ponovljivost mjerne površine, ponovljivost mjerenja koncentracije, ponovljivost pripreme uzorka te intermedijarne preciznosti.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Materijali**

##### **3.1.1 Kemikalije**

- Metanol (Merck, Njemačka), Ph. Eur (kvaliteta određena Europskom farmakopejom)
- Diklormetan (Supelco/Sigma-Aldrich, SAD), p.a. (pro analysis)
- Standard nikotina (Lipomed, Švicarska), L-nikotin 1 mg/mL u metanolu, HPLC čistoće > 98,5%
- Standard kofeina (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Ph. Eur (kvaliteta određena Europskom farmakopejom)
- Tekući dušik (Messer, Hrvatska)

##### **3.1.2 Laboratorijski pribor i posude**

- Odmjerna tikvica od 100 mL
- Pipeta od 5 mL i 1000  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
- Plastični nastavci za pipete
- Laboratorijske čaše različitih volumena
- Pasteurova pipeta
- Staklene bočice s čepovima
- Alat za otvaranje i zatvaranje čepova na staklenim bočicama
- Špatula
- Plastične lađice za odvagu
- Plastični stalak za staklene bočice s čepovima
- Tarionik s pistilom
- politetrafluoretilenski (eng. Polytetrafluoroethylene, PTFE) membranski filteri za filtraciju uzoraka veličine pora 0,45  $\mu$ m (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

### 3.1.3 Radni instrumenti

- **Plinski kromatograf (GC) sa spektrometrom masa (MS)**

Sve analize provedene su na spregnutom sustavu plinskog kromatografa (GC) i spektrometra masa GC-MS-QP2010 Ultra tvrtke Shimadzu (Slika 10). Nakon optimizacije GC-MS uvjeta, kalibracijska krivulja i svi drugi parametri validacije kao i realni uzorci duhana analizirani su prema metodi 5 koja je opisana u Tablici 4 u poglavlju 3.2.3.1.



*Slika 10. GC-MS-QP2010 Ultra, Shimadzu, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“.*

- **Analitička vaga**

Uzorci su vagani na analitičkoj vagi XS105 DualRange (Mettler Toledo, Švicarska), čiji je maksimalni kapacitet 120 g, a mogućnost očitavanja 0,01 g (Slika 11).





*Slika 11. Analitička vaga XS105 DualRange, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“*

- **Ultrazvučna kupelj**

Ekstrakcija nikotina iz duhana potpomognuta je primjenom ultrazvučne vodene kupelji Branson 5210 (Branson Ultrasonics, SAD) (Slika 12).



*Slika 12. Ultrazvučna vodena kupelj Branson 5210, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“*

- **Stolni homogenizator**

Za miješanje i homogeniziranje uzoraka korišten je stolni homogenizator Stuart (Slika 13).



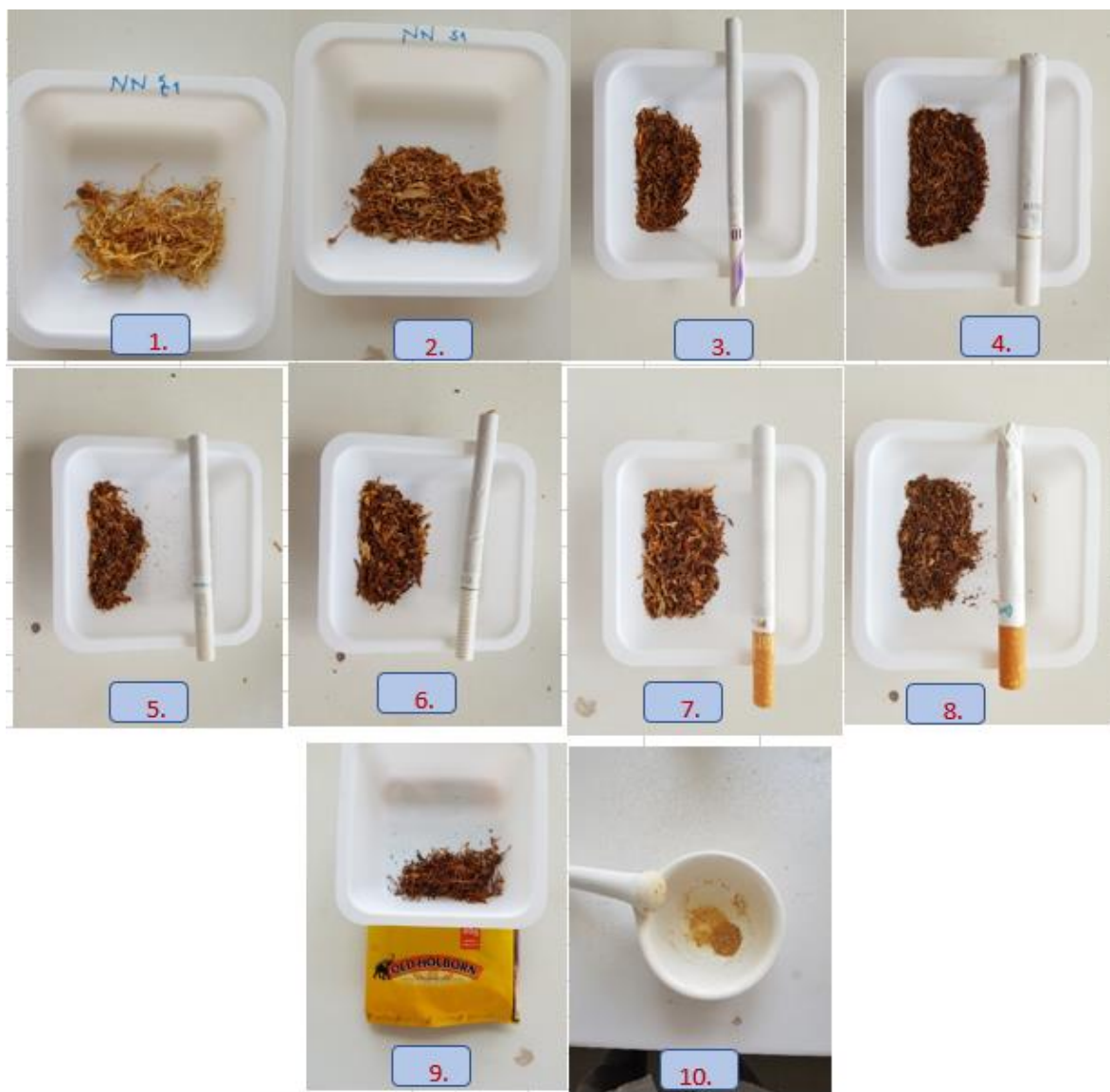
*Slika 13. Stolni homogenizator Stuart, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“*

### **3.1.4 Uzorci**

U ovom diplomskom radu, u svrhu kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu, korišteno je deset uzoraka duhana. Kod šest uzoraka radi se o duhanu iz komercijalno dostupnih cigareta (uzorci 3, 4, 5, 6, 7 i 8), jedan uzorak komercijalno dostupnog duhana za savijanje cigareta (uzorak 9) te tri uzorka rezanog duhana (uzorci 1, 2 i 10) koje je policija oduzela od osoba za koje se sumnjalo da su počinili kazneno djelo nedozvoljene trgovine. Uzorci duhana navedeni su u Tablici 2 i prikazani na Slici 14.

Tablica 2. Prikupljeni uzorci duhana za analizu

Uzorak	
1.	Rezani duhan žuti
2.	Rezani duhan smeđi
3.	LD
4.	Gizeh
5.	Marlboro Touch
6.	Lucky Strike
7.	Marlboro Gold
8.	Chesterfield
9.	Old Holborn
10.	Rezani duhan svjetlije smeđi



Slika 14. Prikaz uzoraka duhana prikupljenih za analizu

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Priprema otopina

#### 3.2.1.1 Priprema standardne otopine kofeina

Na analitičkoj vagi odvagano je 50 mg standarda kofeina koji je kvantitativno, ispiranjem s malim volumenima metanola, prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica je do oznake nadopunjena metanolom i stavljena u ultrazvučnu vodenu kupelj na 15 minuta. Koncentracija tako priređene otopine kofeina kao internog standarda iznosila je 500 µg/mL. Otopina se čuvala u zamrzivaču.

Standardna otopina kofeina korištena kod eksperimentalnog dizajna priređena je istim postupkom uz razliku da je za pripremu otopine upotrijebljena smjesa metanola i diklormetana u omjeru 1:1.

#### 3.2.1.2 Priprema standardnih otopina nikotina

U staklene GC-MS bočice otpipetirani su, prema Tablici 3, određeni volumeni originalne standardne otopine nikotina koncentracije 1 mg/mL, otopine internog standarda kofeina koncentracije 500 µg/mL i metanola. Bočice su zatvorene čepom i homogenizirane na stolnom homogenizatoru 1 minutu. Otopine su čuvane u zamrzivaču. Koncentracija nikotina u tako pripremljenim otopinama bila je u rasponu od 5 do 100 µg/mL, dok je koncentracija kofeina kao internog standarda stalna i iznosila je 50 µg/mL.

Tablica 3. Priprema standardnih otopina nikotina za kalibraciju

<b>Nikotin (1 mg/mL)</b>	<b>Kofein (500 µg/mL)</b>	<b>Metanol</b>	<b><math>\gamma</math>nikotina u smjesi (µg/mL)</b>
<b>V<sub>SO</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>OIS</sub> (µL)</b>	<b>V (µL)</b>	
5,00	100	895	5,00
10,00	100	890	10,00
20,00	100	880	20,00
30,00	100	870	30,00
50,00	100	850	50,00
100,00	100	800	100,00

## 3.2.2 Priprema uzoraka

### 3.2.2.1 Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn, korišten u ovome radu u svrhu optimizacije metode, je Box-Behnkenov dizajn. Optimizacija kao pojam odnosi se na postizanje maksimalnog učinka određene metode. Tradicionalno se prilikom optimizacije određene metode koju karakterizira više varijabli, mijenjala jedna varijabla dok su ostale bile konstantne. Takav oblik optimizacije naziva se „jedna-po-jedna-varijabla“, a potječe od engleskog izraza „one-variable-at-the-time“. Ovakva vrsta optimizacije nije u potpunosti praktična budući da ne omogućava potpuno praćenje međusobnih učinaka varijabli jedna na drugu. Također, otegotna okolnost je i dugotrajnost izvođenja eksperimenata uz povećan materijalni trošak (Bezzera i sur., 2008).

Jedna od prednosti primjene Box-Behnkenovog dizajna jest značajno smanjenje broja eksperimentalnih ispitivanja („run“) potrebnih za dizajniranje modela (Ferreira i sur., 2007). Box-Behnkenov dizajn je jedna od viševarijantnih statističkih metoda temeljena na metodi odzivne površine (engl. *Response Surface Methodology, RSM*) koja koristi polinomne funkcije kako bi opisala određenu metodu i na taj način ju optimizirala. Jednadžba značajna za Box-Behnkenov dizajn je  $N=2k(k-1)+C_0$  gdje je  $N$  broj mjerenja potreban za optimizaciju metode,  $k$  je broj nezavisnih varijabli, a  $C_0$  označava koliko u centralnoj točki ima ponavljanja. Kako je u slučaju kvantitativnog određivanja nikotina važno u što većoj mjeri ekstrahirati ga iz duhana, varijable koje su primarno određene bile su ekstrakcijsko sredstvo (udio metanola) te broj potrebnih ekstrakcija. Treća varijabla, kojoj je u preliminarnoj fazi uočena važnost, bilo je vrijeme soniciranja u ultrazvučnoj kupelji. U Box-Behnkenovom dizajnu sve su tri navedene varijable svedene na tri razine (-1,0,1) kako je i prikazano u Tablici 4 (Bezerra i sur., 2008; Ferreira i sur., 2007).

Tablica 4. Razine korištenih varijabli temeljene na Box-Behnkenovom dizajnu

Razina po Box-Behnkenu	-1	0	1
Vrijeme soniciranja (min)	10	20	30
Udio metanola u otapalu (%)	0	50	100
Broj ekstrakcija	1	2	3

### 3.2.2.2 Priprema uzoraka za optimizaciju metode

Box-Behnkenov dizajn, u svojoj osnovi, predlaže 17 različitih načina pripreme uzoraka s tri različite varijable s ciljem da se matematički odredi utjecaj definiranih varijabli na sadržaj nikotina u ispitivanom uzorku. Tri spomenute varijable bile su vrijeme soniciranja u ultrazvučnoj kupelji, udio metanola za ekstrakciju te broj potrebnih ekstrakcija. Rasponi odabranih varijabli navedeni su u Tablici 4. Kako bi se utvrdio optimalan udio otapala za ekstrakciju korišten je udio od 0, 50 te 100% metanola u diklormetanu. Drugi važan parametar je broj ekstrakcija. Broj ekstrakcija može utjecati na ukupnu ekstrahiranu količinu nikotina odnosno povećati uspješnost same ekstrakcije te je predloženo da se izvedu 1, 2 i 3 ekstrakcije. Soniciranje je jedan parametar koji također može utjecati na uspješnost ekstrakcije te je za vrijeme soniciranja predloženo vrijeme od 10, 20 i 30 minuta.

Redoslijed pripreme uzoraka prikazan je u Tablici 5. uzimajući u obzir sve navedene varijable. U ovom istraživanju\_sveukupno je provedeno 17 ekstrakcija, uključujući 5 ponavljanja u centralnoj točki s (50 % metanola, 2 ekstrakcije, 20 min soniciranja). Iako su se pripreme navedenih uzoraka razlikovale po određenim varijablama, svi uzorci u jednom dijelu pripremljeni su na identičan način. Uzorak korišten za optimizaciju metode bio je uzorak 10 (Tablica 2). Uzorak je stavljen u tarionik te mu je dodan tekući dušik. Tekući dušik omogućuje trenutno smrzavanje duhana i olakšano usitnjavanje pistilom. Usitnjeni duhan se zatim izvagao na analitičkoj vagi izravno u staklenu bočicu, gdje je za svaki uzorak duhana izvagano okvirno 20 mg duhana. Na taj način pripravljeno je 17 odvaga uzoraka duhana te su uzorci nadalje pripremljeni prema specifičnom postupku koji je sažet u Tablici 5.

U svaki uzorak duhana tijekom prve ekstrakcije otpipetira se 0,5 mL standardne otopine kofeina te 4,5 mL otapala za ekstrakciju i to s onim udjelom metanola kako je to navedeno u Tablici 5. Staklena bočica se privremeno zatvori parafilmom te se tako pripremljen uzorak stavlja u ultrazvučnu kupelj i sonicira predviđeno vrijeme. Nakon soniciranja staklena bočica se ostavi mirovati 15 minuta kako bi se duhan istaložio i otopina razbistrila. Protekom potrebnog vremena bistar ekstrakt se pomoću Pasteurove pipete prebaci u novu staklenu bočicu koja se također zatvori parafilmom. Opisani postupak uzimanja ekstrakta jednak je za sve uzorke i nakon svake ekstrakcije. Na taj način uzorci kojima je propisana jedna ekstrakcija prestaju s postupkom, dok oni kojima su propisane višestruke ekstrakcije nastavljaju s postupkom dalje. Kod daljnjih ekstrakcija u uzorak se više ne dodaje standardna otopina kofeina nego samo 5 mL propisanog otapala za ekstrakciju.

Nakon završetka navedenih procesa potrebnih za pojedini uzorak, prikupljeni ekstrakti su pripremljeni za analizu GC-MS tehnikom. Za uzorke kojima je određena jedna ekstrakcija u staklenu epruvetu otpipetira se 300  $\mu\text{L}$  ekstrahirane otopine i 600  $\mu\text{L}$  otapala za ekstrakciju koji je korišten u postupku. Ako su uzorku određene dvije ekstrakcije tada se otpipetira 600  $\mu\text{L}$  smjese ekstrakata prikupljenih nakon 1. i 2. ekstrakcije odnosno 300  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg otapala. Konačno, ako su uzorku određene 3 ekstrakcije otpipetira se 900  $\mu\text{L}$  smjese ekstrakta dobivene nakon 1., 2. i 3. ekstrakcije. Normalizacijom svih otopina na ukupni volumen od 900  $\mu\text{L}$  postiže se jednako razrjeđenje svih uzoraka. Pripravljene otopine su kroz PTFE membranski filter s veličinom pora 0,45  $\mu\text{m}$  profiltrirane u staklene bočice koje su zatvorene čepom pomoću specijalnog zatvarača analizirane predviđenom metodom.

*Tablica 5.. Predložene varijable uzoraka Box-Behnkenovim eksperimentalnim dizajnom*

Uzorak	Vrijeme soniciranja (min)	Udio metanola u otapalu (%)	Broj ekstrakcija
1	20	50	2
2	20	50	2
3	10	100	2
4	30	50	3
5	30	50	1
6	30	100	2
7	20	100	3
8	20	100	1
9	30	0	2
10	10	50	1
11	20	50	2
12	20	0	3
13	20	50	2
14	10	0	2
15	10	50	3
16	20	0	1
17	20	50	2

### 3.2.2.3 Priprema uzoraka za analizu optimiziranom metodom

Uzorci duhana stavljeni su u tarionik, dodan im je tekući dušik te su usitnjeni pistilom. Približno 20 mg usitnjenog i homogeniziranog duhana izravno je odvagano u staklene bočice.



Uzorcima je zatim dodano 0,5 mL standardne otopine kofeina te 4,5 mL metanola kao ekstrakcijskog sredstva. Staklene bočice su privremeno zatvorene parafilmom i stavljene u ultrazvučnu kupelj u kojoj su sonicirane 20 minuta. Nakon soniciranja bočice se ostave mirovati 15 minuta kako bi se duhan istaložio i otopina razbistrila. Ovaj postupak ponavlja se nakon svakog soniciranja. Nakon prve ekstrakcije ekstrakt se pomoću Pasteurove pipete prenese u novu staklenu bočicu koja se označava i privremeno zatvori parafilmom. Slijedi druga ekstrakcija gdje se duhanu dodaje 5 mL metanola kao ekstrakcijskog sredstva. Bočica se zatvara parafilmom i sonicira 20 minuta. Nakon druge ekstrakcije ponavlja se postupak uzimanja i prijenosa ekstrakta koji se stavlja u staklenu bočicu u kojoj se već nalazi 1. ekstrakt. Slijedi treća ekstrakcija gdje se duhanu dodaje 5 mL metanola, bočica se zatvori parafilmom te ponovno stavlja na soniciranje u ultrazvučnu kupelj na 20 minuta. Po završetku soniciranja i bistrenja otopine na isti način kao i u prethodnim ekstrakcijama uzima se 3. ekstrakt te se prenosi u staklenu bočicu u kojoj se već nalaze dva prethodna ekstrakta. Prikupljene otopine su kroz PTFE membranski filter s veličinom pora 0,45  $\mu\text{m}$  profiltrirane u staklene bočice koje su zatvorene čepom pomoću specijalnog zatvarača i analizirane predviđenom metodom.

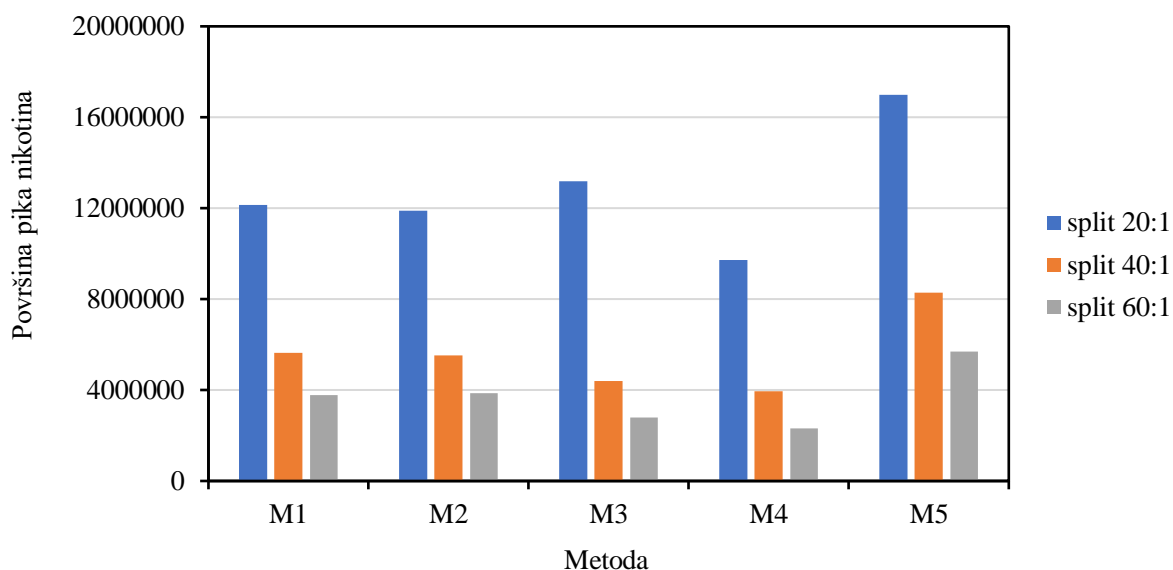
### **3.2.3 Postupak određivanja nikotina u duhanu GC-MS metodom**

#### **3.2.3.1 Optimizacija GC-MS uvjeta**

Kako bi se odredili najbolji instrumentalni uvjeti detekcije nikotina u duhanu ispitano je pet različitih metoda čiji su parametri navedeni u Tablici 6, pri čemu je kriterij za odabir metode bila najveća površina pika nikotina, dobra razlučivost pika i vrijeme trajanja analize. Dobivena ovisnost površine pika nikotina o metodi i "split" omjeru grafički je prikazana na Slici 15. Metoda 1 preuzeta je iz literature (Şpaiuc i sur., 2014), metoda 2 propisana je od strane CORESTA-e (*Cooperation centre for scientific research relative to tobacco*) (2020). Metoda 3 također je preuzeta iz literature (Hossain i Salehuddin, 2013). Metode 4 i 5 postavljene su u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ i primjenjuju se kod kvalitativne analize lakozapaljivih tekućina odnosno droga. Kao uzorak korišteno je 200 mg duhana koji je ekstrahirano s 15 mL otopine metanola i diklormetana, pomiješanih u omjeru 1:1, dok je ekstrakcija potpomognuta miješanjem 20 minuta u ultrazvučnoj kupelji. Dobiveni ekstrakt profiltriran je kroz PTFE membranski filter s veličinom pora 0,45  $\mu\text{m}$  i analiziran predviđenim metodama.

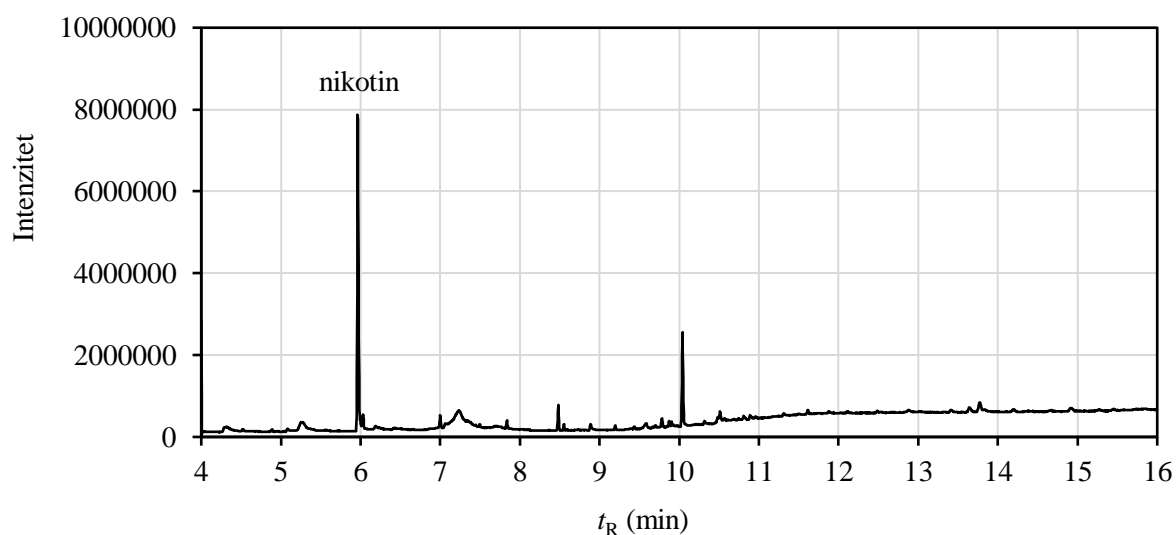
Tablica 6. Optimizacija GC-MS parametara

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3	Metoda 4	Metoda 5
<b>Kromatografski uvjeti</b>					
<b>kolona</b>	HP-1 MS, 30 m, unutarnji promjer 0,25 $\mu$ m, vanjski promjer 0,25 mm				
<b>način injektiranja</b>	razdvajanje protoka ( <i>split</i> )				
<b>"split" omjer</b>	20:1 ; 40:1 ; 60:1				
<b>temperatura injektora</b>	270 °C				260 °C
<b>plin nosilac</b>	Helij				
<b>protok kroz kolonu</b>	0,95 mL/min	0,94 mL/min	1,00 mL/min	1,00 mL/min	1,50 mL/min
<b>režim peći s kolonom</b>	T <sub>min</sub> 100 °C t <sub>100°C</sub> 0 min V <sub>zag</sub> 10 °C/min T <sub>1</sub> 190 °C t <sub>190 °C</sub> 0 min V <sub>zag</sub> 20 °C/min T <sub>max</sub> 280 °C t <sub>280 °C</sub> 5 min	T <sub>min</sub> 110 °C t <sub>110°C</sub> 1 min V <sub>zag</sub> 10 °C/min T <sub>max</sub> 235 °C t <sub>235 °C</sub> 4 min	T <sub>min</sub> 50 °C t <sub>50°C</sub> 0 min V <sub>zag</sub> 8 °C/min T <sub>1</sub> 200 °C t <sub>200 °C</sub> 20 min V <sub>zag</sub> 10 °C/min T <sub>max</sub> 300 °C t <sub>300 °C</sub> 4 min	T <sub>min</sub> 45 °C t <sub>45°C</sub> 3,7 min V <sub>zag</sub> 10 °C/min T <sub>max</sub> 295 °C t <sub>295 °C</sub> 10 min	T <sub>min</sub> 80 °C t <sub>80°C</sub> 2 min V <sub>zag</sub> 25 °C/min T <sub>max</sub> 300 °C t <sub>300°C</sub> 5,2 min
<b>trajanje snimanja</b>	18,50 min	17,50 min	52,75 min	38,70 min	16,00 min
<b>MS uvjeti</b>					
<b>detektor</b>	kvadrupolni detektor				
<b>energija elektrona</b>	70 eV				
<b>raspon m/z</b>	45 – 550 Da				
<b>brzina snimanja</b>	1111				3333
<b>temperatura međuspoja</b>	295 °C				
<b>temperatura ionskog izvora</b>	230 °C				200 °C
<b>odgoda snimanja</b>	5 min				4 min



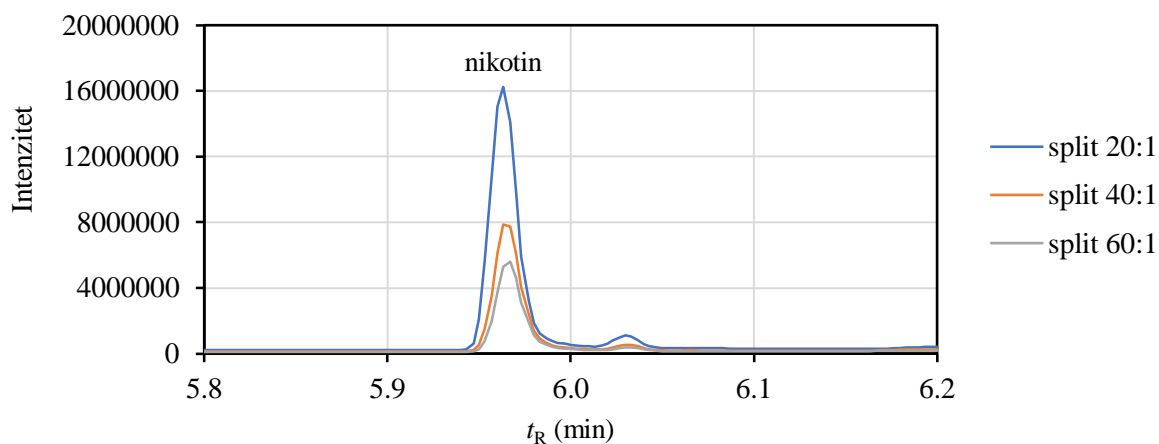
Slika 15. Ovisnost visine pika nikotina o primijenjenoj metodi i "split" omjeru

Optimizacija GC-MS programa primarno se odnosila na promjenu temperaturnog režima kolone u plinskom kromatografu, dok su kod metode 5 dodatno promijenjeni i parametri spektrometra masa koji se odnose na temperaturu ionskog izvora i brzinu snimanja. Kako se vidi iz Slike 15, najbolji odziv instrumenta u obliku najvećih površina pika nikotina dobiven je za metodu 5, pri čemu pik nikotina na vremenu zadržavanja ( $t_R$ ) od 5,95 minuta ima dobro definiran Gaussov oblik (Slika 16) i odijeljen je od drugih pikova u kromatogramu.



Slika 16. Kromatogram uzorka duhana dobiven analizom na sustavu GC-MS s parametrima metode 5 i "split" omjerom 40:1

Ove karakteristike nisu narušene niti promjenom uvjeta razdvajanja protoka („split“ omjeri) kojima se regulira udio uzorka koji se ubrizgava na kolonu (Slika 17).



Slika 17. Izdvojeni dio kromatograma uzorka duhana dobiven analizom na sustavu GC-MS s parametrima metode 5 uz različite "split" omjere

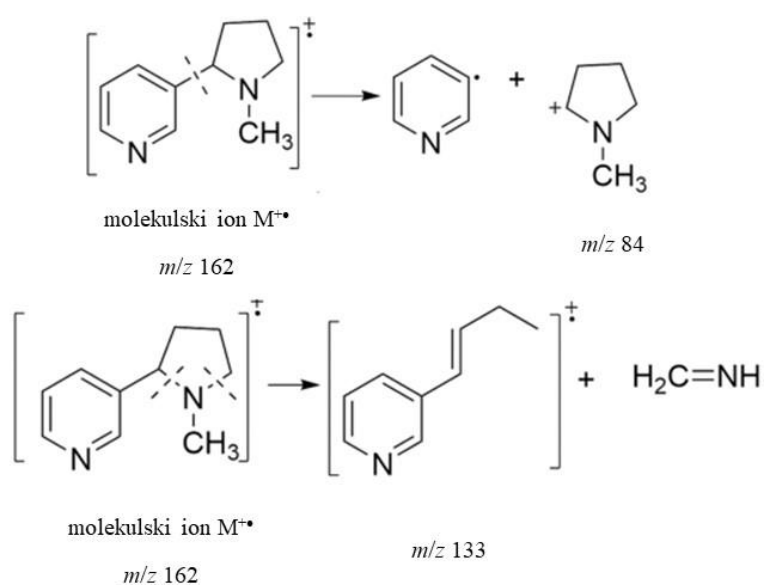
Za omjere razdvajanja ili „split“ omjere vrijedi da što je omjer veći to je manja količina uzorka koja ulazi na kolonu, čime se izravno može utjecati na površinu, oblik i razlučivost pikova u kromatogramu. Prilagodбом „split“ omjera istovremeno se može izbjeći ukoncentriravanje uzorka ako je pik u kromatogramu premali što je pogodno za analizu analita u tragovima, odnosno razrjeđivanje uzorka kod prevelikih i slabo razlučenih pikova kao posljedice previsoke koncentracije promatranog analita. Iako je prema CORESTA metodi broj 87 (2020) za određivanje nikotina u duhanu pomoću GC-MS tehnike preporučeni „split“ omjer 60:1, prema dobivenim vrijednostima površina pika duhana pretpostavljeno je da bi ovaj omjer kod nižih koncentracija nikotina u uzorku mogao dovesti do odziva koji bi bio niži od granice kvantifikacije metode. Isto tako, omjer razdvajanja 20:1 bi kod viših koncentracija mogao dovesti do zasićenja kolone i detektora te se ne bi mogao koristiti u kvantitativne svrhe. Stoga je procijenjeno da je 40:1 optimalan omjer razdvajanja koji bez neželjenih posljedica može podnijeti kako povećanje tako i smanjenje koncentracije nikotina u nepoznatim uzorcima duhana. Ako se u obzir uzme i najkraće vrijeme trajanja analize od 16 minuta, metoda 5 uz omjer razdvajanja 40:1, pokazala se kao najbolja i u daljnjem radu je korištena za razvoj i validaciju metode ekstrakcije nikotina iz duhana kao i njegovu kvantitativnu analizu.

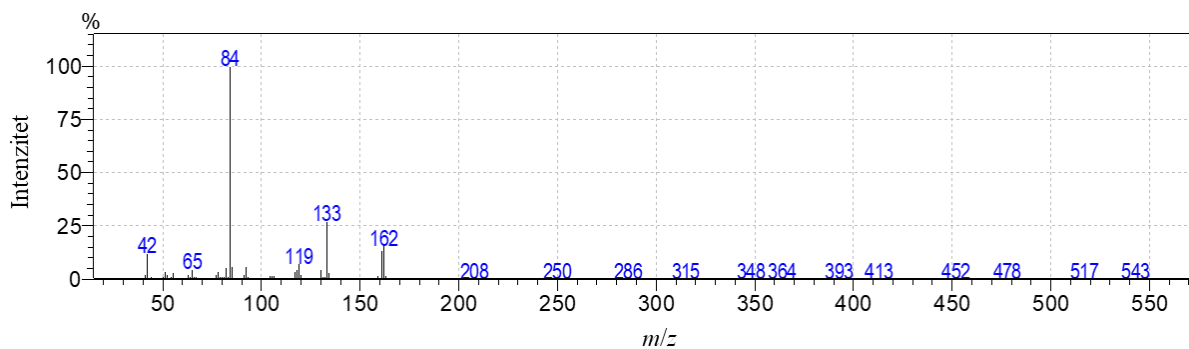
### 3.2.3.2 Metoda analize

Za analizu je korištena „SCAN“ metoda koja rezultira kromatogramom ukupne ionske struje (TIC), a kvantifikacija je provedena metodom internog standarda. Kako je sažeto u Tablici 7 kao kvantitativni ion za nikotin korišten je  $m/z$  84, dok su kvalitativni ili potvrdni ioni bili  $m/z$  133 i 162. Kvantitativni ion za kofein kao interni standard je  $m/z$  194, a potvrdni ioni  $m/z$  109 i 55. Spektri masa nikotina i kofeina, kao i predloženi mehanizmi fragmentacije molekula prikazani su na Slici 18 i Slici 19.

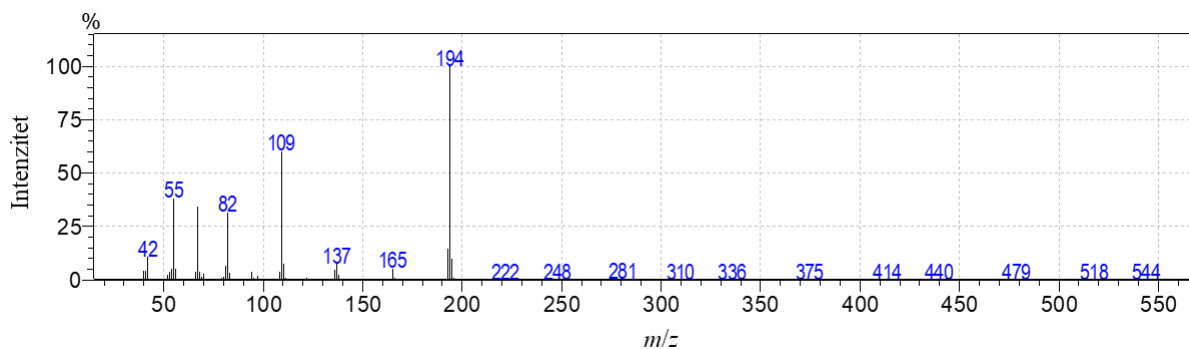
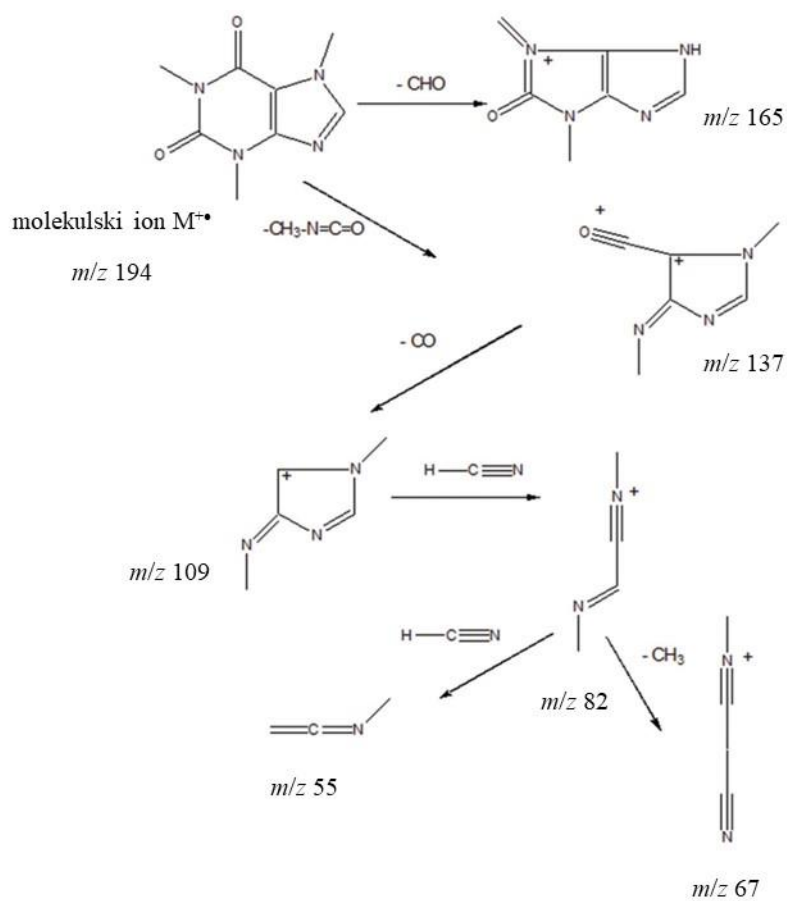
Tablica 7. Vrijeme zadržavanja te omjeri mase i naboja ( $m/z$ ) korišteni za kvantifikaciju i identifikaciju nikotina i kofeina.

Analit	Vrijeme zadržavanja (min)	Kvantifikacijski ion	Potvrdni ioni
nikotin	5,98	84	133, 162
kofein	8,30	194	109, 55





Slika 18. Mehanizam fragmentacije molekule nikotina (preuzeto i prilagođeno prema (Patel i sur.,2020)) i pripadajući spektar masa (preuzeto i prilagođeno prema (NIST17, 2017))



*Slika 19. Mehanizam fragmentacije molekule kofeina (preuzeto i prilagođeno prema (Al-Salman, 2018) i pripadajući spektar masa (preuzeto i prilagođeno prema (NIST17, 2017))*

### **3.3 Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka napravljena je računalnim programom Microsoft Excel 2016 koji je dio programa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Dizajn eksperimenta temeljio se na Box-Behnkenovom modelu koji je obrađen u program Design Expert 12.0.8.0. (Stat-Ease, SAD). Valjanost modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA), pri čemu su P-vrijednosti manje od 0,05 smatrane statistički značajnima.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Optimizacija metode

#### 4.1.1 Eksperimentalni dizajn

Box-Behnkenov eksperimentalni dizajn korišten je kako bi se utvrdila optimalna metoda određivanja koncentracije nikotina, što podrazumijeva metodu odrađenu u što kraćem mogućem vremenu, uz što veću točnost i pouzdanost te ekonomičnost. Navedeni eksperimentalni dizajn temelji se na raznim matematičkim i statističkim obradama, točnije na metodi odzivne površine. Sama statistička i matematička obrada temelji se analiziranju utjecaja korištenih nezavisnih varijabli na spomenuti odziv. U Tablici 8 prikazano je 17 različitih načina pripreme uzoraka duhana (uzorak 10) na temelju različito postavljenih nezavisnih varijabli. Nezavisne varijable u ovom istraživanju bile su vrijeme soniciranja u minutama, udio metanola u otapalu za ekstrakciju u postocima te broj provedenih ekstrakcija uzoraka duhana. Omjeri površina nikotina i kofeina koji su proporcionalni koncentraciji nikotina u duhanu bili su u rasponu od 0,20 do 1,12.

Tablica 8. Sadržaj nikotina u uzorku duhana (uzorak 10) - Box-Behnken dizajn

Ru n	Vrijeme soniciranja (min)	Udio metanola u otapalu (%)	Broj ekstrakcija	A(nikotin)/A(kofein)
1	20	50	2	0,92
2	20	50	2	0,75
3	10	100	2	0,20
4	30	50	3	0,86
5	30	50	1	0,26
6	30	100	2	1,11
7	20	100	3	1,12
8	20	100	1	0,75
9	30	0	2	0,98
10	10	50	1	0,88
11	20	50	2	0,81
12	20	0	3	0,92
13	20	50	2	0,85
14	10	0	2	0,23
15	10	50	3	0,16
16	20	0	1	0,76
17	20	50	2	0,72



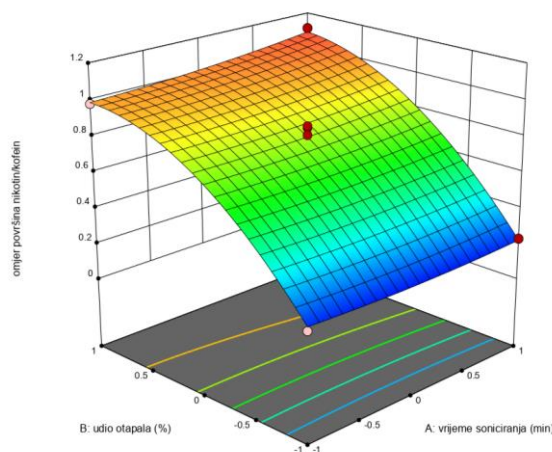
Višestrukom regresijskom analizom eksperimentalnih podataka, temeljenom na Box-Behnkenovom dizajnu, pokazano je kako je upravo model kvadratne polinomne jednadžbe najbolji za opisivanje ponašanje triju nezavisnih varijabli u samome eksperimentu.

$$\text{omjer površine} \frac{\text{nikotina}}{\text{kofein}} = 0,0175 \cdot X_1^2 - 0,1875 \cdot X_2^2 + 0,0075 \cdot X_3^2 + 0,0250 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,010 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,07 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,0250 \cdot X_1 + 0,4075 \cdot X_2 + 0,05250 \cdot X_3 + 0,800$$

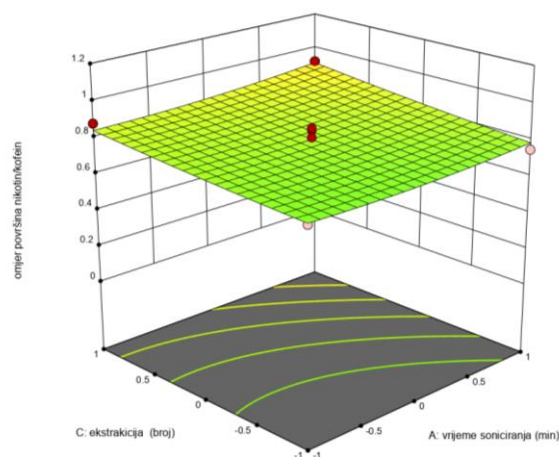
gdje je:

- $X_1$  – vrijeme soniciranja
- $X_2$  – udio otapala
- $X_3$  – broj ekstrakcija

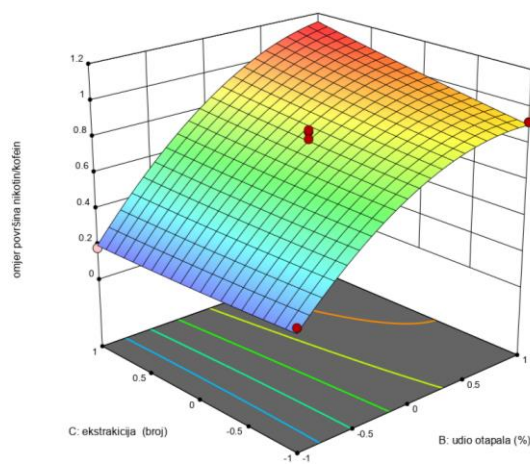
Na temelju navedenog matematičkog modela i funkcija izrađeni su i grafički trodimenzionalni prikazi odzivne površine (Slike 20, 21 i 22). Na grafičkim se prikazima može uočiti kako dvije nezavisne varijable utječu na koncentraciju nikotina u duhanu. Ukupno je prikazano tri grafička prikaza gdje je u svakome jedna nezavisna varijabla konstantna, a ostale dvije nezavisne varijable su uzete u obzir.



Slika 20. Odzivna površina omjera površina pikova nikotina i kofeina u ovisnosti o udjelu metanola u otapalu i vremenu soniciranja



Slika 21. Odzivna površina omjera površina pikova nikotina i kofeina u ovisnosti o broju ekstrakcija i vremenu soniciranja



Slika 22. Odzivna površina omjera površina pikova nikotina i kofeina u ovisnosti broja ekstrakcija i udjela metanola u otapalu

Valjanost odabranog polinomnog modela potvrđena je analizom varijance (ANOVA). Odabrani kvadratni model pokazao se statistički značajnim (P-vrijednost < 0,05). Vrijednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) od 0,9867 pokazuje dobru reprezentativnost modela. Odstupanje modela se nije pokazalo kao statistički značajno, na što ukazuje niska F-vrijednost te visoka P-vrijednosti (Tablica 9).

Tablica 9: Analiza varijancije (ANOVA) za kvadratni model optimizacije.

Izvor	SS	df	MS	F-vrijednost	P-vrijednost
Model	1,53	9	0,1696	57,91	<0,0001
Odstupanje modela	0,0063	3	0,0021	0,5915	0,7549
Čista pogreška	0,0142	4	0,0035		

SS = zbroj kvadrata; df = stupnjevi slobode; MS = aritmetička sredina kvadrata

Uloga eksperimentalnog dizajna i optimizacije metode kvantitativnog određivanja nikotina u uzorcima duhana bila je pronaći najoptimalniju metodu s najvećom ekonomičnošću i pouzdanošću. Kako se može vidjeti na grafovima najbolji rezultati nalaze se na razini 1 što se odnosi na udio metanola u otapalu 100%, dakle čisti metanol kao ekstrakcijsko sredstvo, dok su za broj ekstrakcija određene 3 ekstrakcije. Razina 1 bila je najznačajnija i kod vremena soniciranja, što se odnosi na 30 minuta. Međutim, kako je vidljivo na grafičkom prikazu ovisnosti broja ekstrakcija i vremena soniciranja (Slika 21), kao i na grafičkom prikazu ovisnosti udjela metanola u otapalu o vremenu soniciranja (Slika 20), nije pokazana velika razlika između razine 0 i 1 kod vremena soniciranja. U tom smislu, kako je uloženo vrijeme analitičara također bitan faktor optimizacije metode utemeljene na ekonomičnosti, za vrijeme soniciranja uzeta je razina 0, točnije 20 minuta.

## 4.2 Validacija analitičke metode

### 4.2.1 Parametri validacije i kriteriji prihvatljivosti

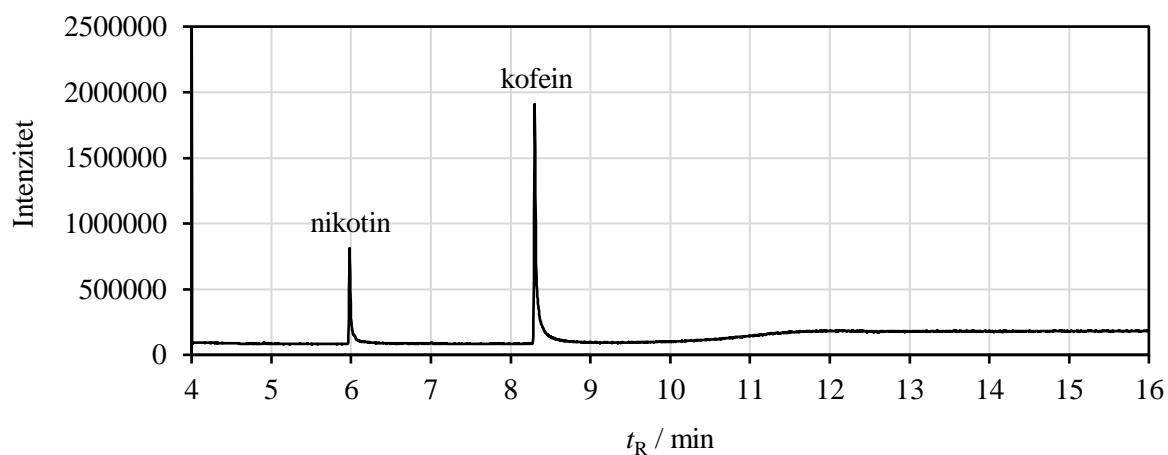
Kriteriji prihvatljivosti za pojedine parametre validacije postavljeni su sukladno preporukama CORESTA metode 87 (2020) koja se odnosi na određivanje nikotina u duhanskim proizvodima GC-MS metodom i prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Sažeti prikaz parametara validacije i kriterija prihvatljivosti.

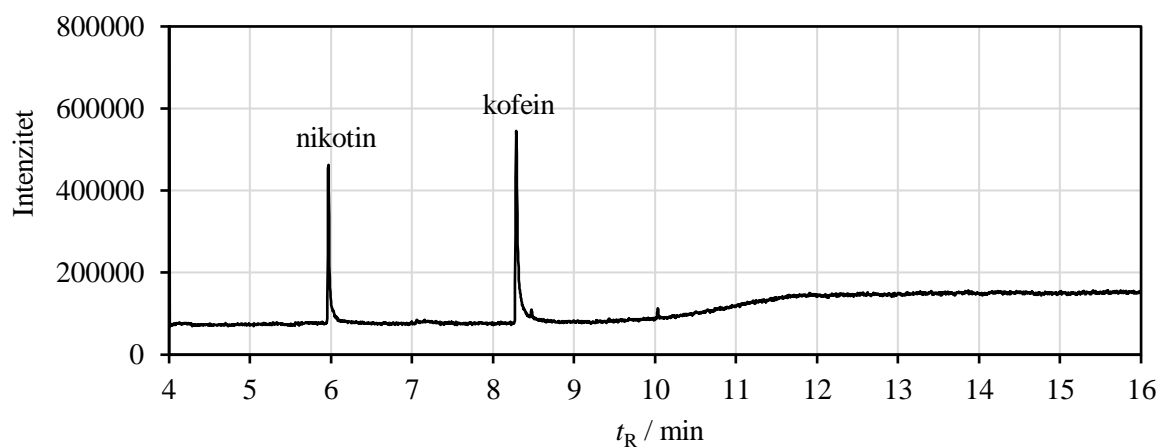
Parametar	Kriterij prihvatljivosti
Selektivnost	međusobna razdvojenost pikova u kromatogramu > 0,4 min
Granica kvantifikacije	donja granica kvantifikacije mora omogućiti analizu uzoraka duhana s 0,5% udjela nikotina
Kalibracijska krivulja	
– koeficijent kalibracije	$R \geq 0,995$
– koeficijent determinacije	$R^2 \geq 0,995$
Preciznost	
– ponovljivost mjerenja površine	$RSD \leq 5 \%$
– ponovljivost mjerenja koncentracije	$RSD \leq 5 \%$
– ponovljivost pripreme uzorka	razlika između dva uzorka $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ ili 0,5 %
– intermedijarna preciznost	$RSD \leq 5 \%$
Točnost	90 – 110 %

#### 4.2.2 Selektivnost

Kromatogrami standardne otopine nikotina koncentracije 20  $\mu\text{g/mL}$  i duhana (uzorak 10) pripravljenog prema razvijenoj metodi prikazani su na Slikama 23 i 24. Kod oba kromatograma dominiraju dobro razdvojeni pikovi nikotina i kofeina pravilnog oblika, pri čemu nisu uočeni pikovi drugih spojeva.



Slika 23. Kromatogram standardne otopine nikotina ( $\gamma=20 \mu\text{g/mL}$ ) korišten za izradu kalibracijske krivulje



Slika 24. Kromatogram duhana (uzorak 10) pripremljen prema razvijenoj metodi

Vremena zadržavanja pikova nikotina i kofeina razlikuju se za više od dvije minute, čime je zadovoljen postavljeni kriterij prihvatljivosti.

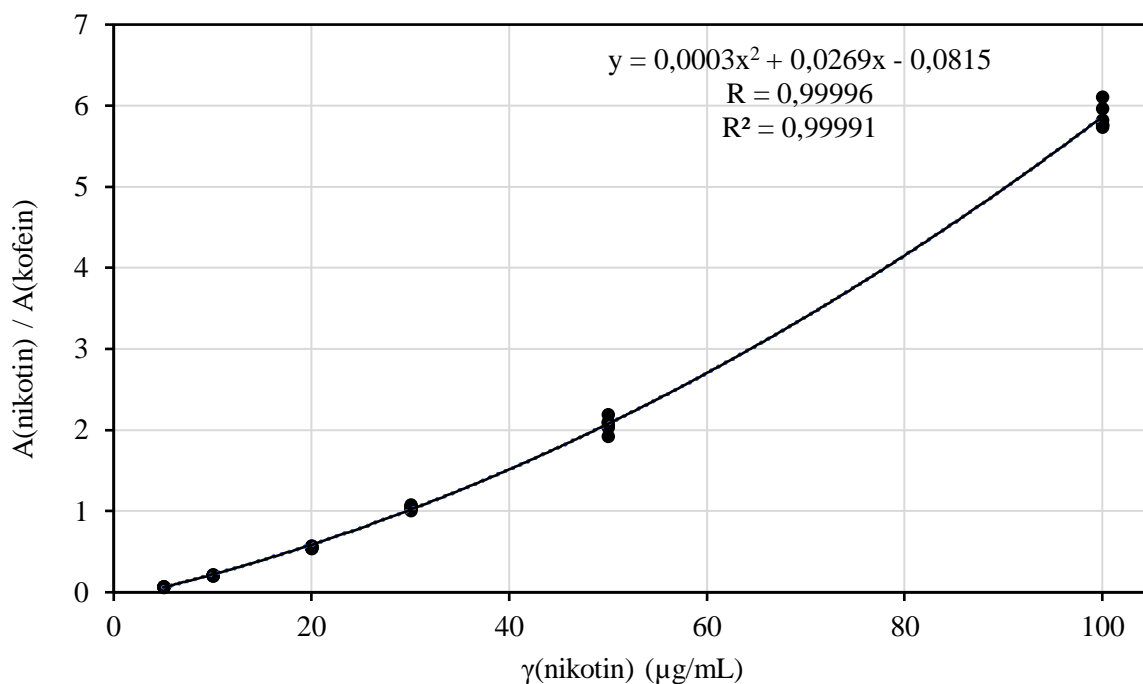
#### 4.2.3 Kalibracijska krivulja

Kalibracijska krivulja određena je pomoću standardnih otopina nikotina pripremljenih na način opisan u poglavlju 3.2.1.2. Za svaku od šest koncentracija nikotina u rasponu 5 do 100  $\mu\text{g/mL}$  pripremljene su po dvije paralelne otopine i svaka je analizirana tri puta. Dobiveni rezultati omjera površina nikotina i kofeina prikazani su u Tablici 10 i na Slici 25. Rezultati su

izraženi i kao srednja vrijednost mjerenja (SV), standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD %).

Tablica 10. Rezultati određivanja kalibracijske krivulje

$\gamma$ (nikotin) ( $\mu\text{g/mL}$ )		A(nikotin)/A(kofein)	$\gamma$ (nikotin) ( $\mu\text{g/mL}$ )		A(nikotin)/A(kofein)
5,00	otopina 1	0,07349	30,00	otopina 1	1,06286
		0,07553			1,03938
		0,06446			1,06893
	otopina 2	0,07445		otopina 2	1,01141
		0,07303			1,08458
		0,07214			1,03296
<b>SV</b>		<b>0,07218</b>	<b>SV</b>		<b>1,05002</b>
<b>SD</b>		<b>0,03960</b>	<b>SD</b>		<b>0,02688</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>5,49</b>	<b>RSD (%)</b>		<b>2,56</b>
10,00	otopina 1	0,21570	50,00	otopina 1	2,09939
		0,21057			2,04008
		0,21762			2,04975
	otopina 2	0,22175		otopina 2	2,09847
		0,20558			1,92592
		0,20992			2,19645
<b>SV</b>		<b>0,21353</b>	<b>SV</b>		<b>2,06834</b>
<b>SD</b>		<b>0,00590</b>	<b>SD</b>		<b>0,89112</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>2,76</b>	<b>RSD (%)</b>		<b>4,31</b>
20,00	otopina 1	0,54531	100,00	otopina 1	6,11291
		0,55845			5,73745
		0,57313			5,77130
	otopina 2	0,56637		otopina 2	5,76016
		0,55410			5,96756
		0,54768			5,82845
<b>SV</b>		<b>0,55751</b>	<b>SV</b>		<b>5,86230</b>
<b>SD</b>		<b>0,01078</b>	<b>SD</b>		<b>0,14787</b>
<b>RSD (%)</b>		<b>1,93</b>	<b>RSD (%)</b>		<b>2,52</b>
<b><math>y = 0,0003x^2 + 0,0269x - 0,0815</math></b>					
<b>R = 0,99996</b>					
<b>R<sup>2</sup> = 0,99991</b>					



Slika 25. Kalibracijska krivulja ovisnosti omjera površina pikova nikotina i kofeina o masenoj koncentraciji nikotina

Iz grafičkog prikaza i jednačbe krivulje vidljivo je da ovisnost omjera površina pikova nikotina i kofeina o masenoj koncentraciji nikotina odražava polinom drugog stupnja odnosno kvadratnu funkciju. Koeficijenti korelacije i determinacije iznose 0,99996 odnosno 0,99991, što zadovoljava postavljene parametre validacije.

#### 4.2.4 Ponovljivost mjerenja površine i koncentracije

Ponovljivost mjerenja ispitana je na standardnom uzorku nikotina koncentracije 25  $\mu\text{g/mL}$ , kao i na uzorku duhana (uzorak 10) nepoznate koncentracije nikotina koji je pripremljen prema propisu opisanom u poglavlju 3.2.2.3. Svaka otopina analizirana je deset puta. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 11, a izraženi su kao srednja vrijednost (SV) pojedinačnih mjerenja, odnosno kao standardno odstupanje (SD) i relativno standardno odstupanje (RSD %).

Tablica 11. Rezultati provjere ponovljivosti mjerenja na standardnom uzorku nikotina koncentracije 25 µg/mL i na uzorku duhana (uzorak 10)

Standardna otopina nikotina γ = 25 µg/mL				Duhan (uzorak 10)			
A(nikotin)/A(kofein)		γ (µg/mL) izmjerena		A(nikotin)/A(kofein)		γ (µg/mL) izmjerena	
0,69679		22,71		1,06000		30,90	
0,70569		22,92		1,03582		30,38	
0,70021		22,79		1,03539		30,37	
0,72661		23,41		1,06285		30,95	
0,71143		23,06		1,09587		31,66	
0,69797		22,74		1,07379		31,19	
0,70739		22,96		1,10283		31,80	
0,70344		22,87		1,08215		31,36	
0,70705		22,95		1,08775		31,49	
0,71342		23,10		1,08352		31,40	
<b>SV</b>	<b>0,70700</b>	<b>SV</b>	<b>22,95</b>	<b>SV</b>	<b>1,07200</b>	<b>SV</b>	<b>31,15</b>
<b>SD</b>	<b>0,00877</b>	<b>SD</b>	<b>0,21</b>	<b>SD</b>	<b>0,02330</b>	<b>SD</b>	<b>0,50</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,24</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>0,90</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>2,17</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>1,59</b>

Dobivene vrijednosti za relativno standardno odstupanje (RSD %) omjera površina i koncentracije zadovoljavaju zahtjev ponovljivosti mjerenja.

#### 4.2.5 Ponovljivost pripreme uzorka

Ponovljivost metode pripreme uzorka određena je na uzorku duhana (uzorak 10) na način da je jedan analitičar u istom danu, prema propisu opisanom u poglavlju 3.2.2.3, pripremio dva uzorka duhana. Svaka otopina analizirana je tri puta za redom. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 12, a izraženi su kao razlika srednjih vrijednosti koncentracija odnosno razlika masenih udjela (%) nikotina u duhanu.



Tablica 12. Rezultati provjere ponovljivosti metode na uzorku duhana (uzorak 10).

	$\gamma$ (nikotin) ( $\mu\text{g/mL}$ )		$w$ (nikotin) (%)	
	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 1	uzorak 2
	30,90	31,65	2,32	2,37
	30,38	31,91	2,28	2,39
	30,37	31,61	2,28	2,37
<b>SV</b>	<b>30,55</b>	<b>31,72</b>	<b>2,29</b>	<b>2,38</b>
<b>razlika</b>	<b>1,17</b>		<b>0,09</b>	

Podaci za razliku vrijednosti koncentracija odnosno masenih udjela nikotina u duhanu zadovoljavaju zahtjev ponovljivosti metode.

#### 4.2.6 Međupreciznost (intermedijarna preciznost)

Međupreciznost ili intermedijarna preciznost određena je na uzorku duhana (uzorak 10) na način da su tri analitičara tijekom tri dana, prema propisu opisanom u poglavlju 3.2.2.3, pripremila po jedan uzorak duhana. Svaka otopina analizirana je tri puta za redom. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 13, a izraženi su kao relativno standardno odstupanje (RSD %) srednjih vrijednosti koncentracija odnosno masenih udjela nikotina u duhanu.

Tablica 13. Rezultati provjere međupreciznosti na uzorku duhana (uzorak 10)

Datum	$\gamma$ (nikotin) ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	analitičar 1	analitičar 2	analitičar 3
Prvi dan	30,90	30,87	33,40
	30,38	32,01	33,44
	30,37	30,58	33,67
Drugi dan	29,59	30,87	33,05
	30,56	30,60	32,50
	29,98	30,09	33,16
Treći dan	30,14	31,93	33,36
	29,39	31,90	31,40
	30,30	32,16	32,07
<b>SV</b>	<b>31,43</b>		
<b>SD</b>	<b>1,31</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>4,18</b>		

Datum	w (nikotin) (%)		
	analitičar 1	analitičar 2	analitičar 3
Prvi dan	2,32	2,31	2,51
	2,28	2,40	2,51
	2,28	2,29	2,53
Drugi dan	2,22	2,32	2,44
	2,29	2,30	2,40
	2,25	2,26	2,45
Treći dan	2,24	2,39	2,50
	2,19	2,39	2,36
	2,26	2,41	2,41
<b>SV</b>	<b>2,35</b>		
<b>SD</b>	<b>0,10</b>		
<b>RSD (%)</b>	<b>4,09</b>		

Podaci za relativno standardno odstupanje (RSD %) koncentracije odnosno masenih udjela nikotina u duhanu zadovoljavaju zahtjev međupreciznosti metode.

#### 4.2.7 Točnost

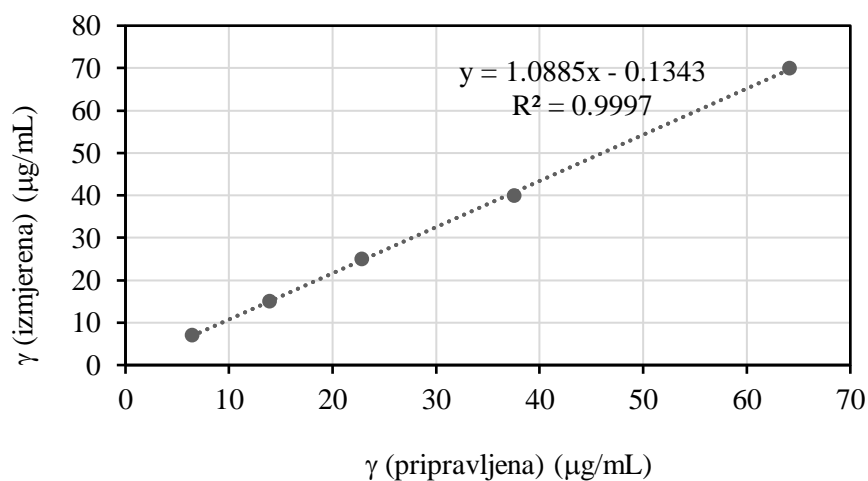
Točnost metode provjerena je analizom pet standardnih otopina nikotina koncentracija u rasponu kalibracijske krivulje. Standardne otopine pripravljene su sukladno Tablici 14, a svaka otopina analiziran je tri puta. Točnost analitičkog postupka izražena je kao srednje iskorištenje odnosno srednje slaganje između stvarnih i dobivenih vrijednosti koncentracija. Rezultati su prikazani u Tablici 15 i grafički na Slici 26.

Tablica 14. Priprema standardnih otopina nikotina za provjeru točnosti metode

Nikotin (1 mg/mL)	Kofein (500 µg/mL)	Metanol	γkofeina u smjesi (µg/mL)
V <sub>so</sub> (µL)	V <sub>ois</sub> (µL)	V (µL)	
7,00	100	893	7,00
15,00	100	885	15,00
25,00	100	875	25,00
40,00	100	860	40,00
70,00	100	830	70,00

Tablica 15.. Rezultati provjere točnosti metode na uzorcima standardnih otopina nikotina

$\gamma$ (pripravljena) ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\gamma$ (izmjerena) ( $\mu\text{g/mL}$ )	SV izmjerene koncentracije	Iskorištenje, analitički prinos (%)
7,00	6,59	6,43	108,9
	6,53		
	6,16		
15,00	13,81	13,93	107,7
	13,87		
	14,10		
25,00	22,71	22,81	109,6
	22,92		
	22,79		
40,00	37,49	37,55	106,5
	37,73		
	37,43		
70,00	64,06	64,15	109,1
	65,11		
	63,27		
		<b>SV</b>	<b>108,4</b>
		<b>SD</b>	<b>1,25</b>
		<b>RSD (%)</b>	<b>1,16</b>



Slika 26. Grafički prikaz odnosa pripravljene i izmjerene koncentracije otopine standarda nikotina

Vrijednost srednjeg iskorištenja nalaze se u rasponu  $100\pm 10\%$  čime je zadovoljen zahtjev točnosti analitičkog postupka.

#### 4.2.8 Granica određivanja

Granica određivanja provjerena je temeljem omjera signala i šuma standardnog uzorka koncentracije  $7 \mu\text{g/mL}$  koji je korišten za provjeru parametra točnosti. Koncentracija od  $7 \mu\text{g/mL}$  nikotina u otopini u stvarnosti odgovara udjelu nikotina u duhanu od  $0,52\%$ .

Omjer signala i šuma pika nikotina koncentracije  $7 \mu\text{g/mL}$  u otopini iznosi 34 čime je zadovoljen postavljeni kriterij.

### 4.3 Određivanje udjela nikotina u realnim uzorcima duhana

Razvijena metoda ekstrakcije kao i GC-MS metoda analize primijenjene su za određivanje masenog udjela (%) odnosno koncentracije nikotina (mg/g) u duhanu iz cigareta poznatih proizvođača (uzorci 3, 5, 6, 7, 8 i 9), u duhanu za motanje (punjenje) cigareta (uzorak 4) te u tri uzorka rezanog duhana nepoznatog porijekla (uzorci 1, 2 i 10) koje je policija oduzela od osoba za koje se sumnjalo da su počinili kazneno djelo nedozvoljene trgovine. Od svakog uzorka duhana pripravljena su dva ekstrakta te analizirani validiranom metodom. Oznake uzoraka kao i dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 16, a krajnji rezultati iskazani su kao srednja vrijednost masenog udjela dvije ekstrakcije, odnosno srednja vrijednost koncentracije nikotina po gramu duhana. Prilikom iskazivanja rezultata nije uzeta u obzir vlažnost uzorka.

Maseni udio (%) nikotina u uzorku duhana određen je prema jednadžbi (2), dok je koncentracija nikotina (mg/g) izračunata prema izrazu (3).

$$\text{nikotin (\%)} = \frac{\gamma (\mu\text{g mL}^{-1})}{m (\text{mg})} \times V(\text{mL}) \times \frac{100}{1000 (\mu\text{g})} \quad (2)$$

$\gamma$  – koncentracija nikotina dobivena iz kalibracijske krivulje ( $\mu\text{g/ml}$ )

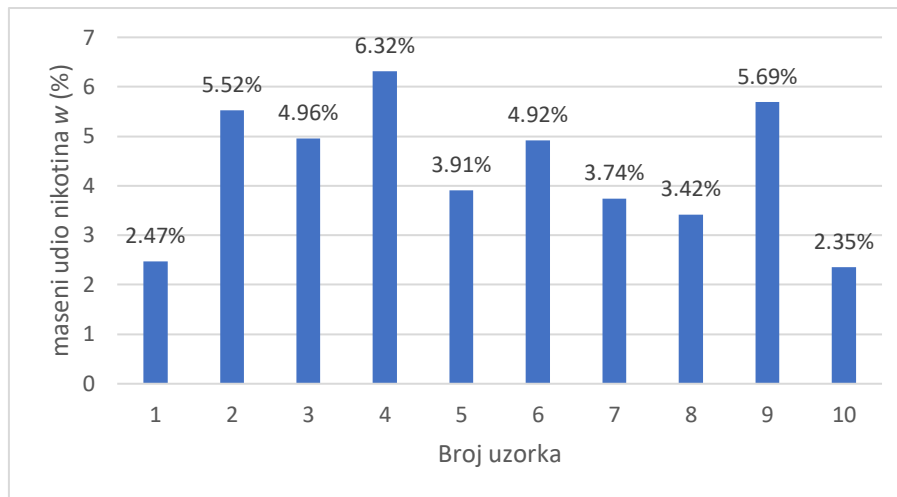
$m$  – masa ekstrahiranog duhana (mg)

$V$  – volumen otopine nakon ekstrakcija (15 mL)

$$\text{nikotin (mg/g)} = \frac{\text{nikotin (\%)} \times 1 \text{ g} \times 1000}{100} \quad (3)$$

Tablica 16. Rezultati provjere točnosti metode na uzorcima standardnih otopina nikotina.

Uzorak		$\gamma$ (izmjerena) ( $\mu\text{g/mL}$ )	w nikotina u duhanu (%)	SV w nikotina u duhanu (%)	$\gamma$ nikotina (mg/g)
1.	Rezani duhan žuti	33,23	2,48	2,47	24,74
		32,93	2,46		
2.	Rezani duhan smeđi	74,21	5,57	5,52	55,25
		72,90	5,48		
3.	LD	66,19	4,96	4,96	49,56
		66,09	4,95		
4.	Gizeh	84,27	6,32	6,32	63,20
		84,17	6,32		
5.	Marlboro Touch	52,13	3,90	3,91	39,13
		52,53	3,93		
6.	Lucky Strike	64,56	4,85	4,92	49,23
		66,51	5,00		
7.	Marlboro Gold	49,63	3,71	3,74	37,37
		50,46	3,77		
8.	Chesterfield	46,17	3,45	3,42	34,24
		45,36	3,39		
9.	Old Holborn	75,23	5,65	5,69	56,85
		76,15	5,72		
10.	Rezani duhan svjetlije smeđi	30,90	2,32	2,35	23,48
		31,65	2,38		



*Slika 27. Maseni udjeli nikotina u uzorcima duhana*

Metoda kojom su analizirani uzorci duhana u svrhu kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu, pokazala se kao pouzdana, jednostavna i brza što je i bio cilj optimizacije navedene metode. Maseni udjeli nikotina (prikazani na Slici 27) u uzorcima duhana kretali su se od 2,35% u uzorku broj 10 na kojemu je rađen eksperimentalni dizajn i na kojemu je provedena većina validacijskih parametara, pa do 6,32% kod uzorka broja 4 koji je opisan kao duhan u cigareti Gizeh. Na temelju prikazanih rezultata uočena je određena poveznica između boje duhana s masenim udjelom nikotina u duhanu. Naime uzorci duhana tamnije smeđe boje sadrže viši maseni udio nikotina, što se jasno vidi u usporedbi uzoraka broj 1 i 2. Uzorci duhana komercijalnih cigareta broja 5, 7 i 8 pokazala su sličnost u smislu masenog udjela nikotina. Duhan iz cigareta 3 i 6 također ima sličan udio nikotina koji je istovremeno za oko 1% viši na prethodno spomenute komercijalne uzorke. Od svih uzoraka duhana poznatog porijekla, najveći maseni udio nikotina određen je u uzorku 4.

## 5. ZAKLJUČCI

U ovom radu uspješno je provedena kvantifikacija nikotina u odabranim uzorcima duhana. Za analizu uzoraka primijenjena je plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (GC-MS), a metoda je validirana provjerom niza validacijskih parametara. Svi validacijski parametri (selektivnost, točnost, koeficijent kalibracije i determinacije kalibracijske krivulje, granica kvantifikacije, preciznost izražena kroz ponovljivost mjerne površine, ponovljivost mjerenja koncentracije, ponovljivost pripreme uzorka te intermedijarne preciznosti) zadovoljili su postavljene kriterije prihvatljivosti iz čega se može zaključiti da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu te će se kao kvantitativna metoda određivanja nikotina u duhanu primjenjivati u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, MUP-a RH.

Nadalje, primjenom metodologije odzivne površine u sklopu Box-Behnkenovog dizajna temeljem kojeg je matematički opisan utjecaj ekstrakcijskih parametara na kvantifikaciju nikotina određene su optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli pripreme uzorka koje su obuhvaćale vrijeme soniciranja, vrstu otapala i broj potrebnih ekstrakcija, što je rezultiralo razvojem jednostavne, ekonomične, ekološki prihvatljive i učinkovite metode ekstrakcije nikotina iz duhana.

Rezultati analize prikupljenih uzoraka duhana pokazali su određenu poveznicu između tamnije boje duhana i većeg udjela nikotina, dok je udio nikotina kod većine analiziranih uzoraka duhana iz komercijalno dostupnih cigareta sličan.

## 6. LITERATURA

Al-Salman HNK, Jasim EQ. Analytical methods for diagnosis a mixture of narcotic substances in seized materials. *Int. J. Green Pharm.*, 2018, 12 (3), 216-226.

<sup>a</sup>Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: Implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Ann. Rev. Med.*, 1986, 37, 21-32.

<sup>b</sup>Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine: Implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2008, 83 (4), 531-541.

<sup>c</sup>Benowitz NL. Pharmacology Of Nicotine: Addiction and Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1996, 36, 597-613.

<sup>d</sup>Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: Addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009, 49, 57-71.

Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 2008, 76 (5), 965-977.

Commar A, Prasad V, Tursan d' Espaignet E. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, fourth edition. Ženeva, World Health Organization, 2021, str. 7.

Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco Routine Analytical Chemistry Sub-Group & Tobacco and Tobacco Products Analytes Sub-Group. CORESTA Recommended Method No. 87; Determination of nicotine in tobacco products by GC-MS. 2020.

de Hoffmann E, Stroobant V. Mass Spectrometry Principles and Applications. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2007, str. 266.

Dundović D. Duhan u Republici Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini kroz povijest uzgoja i krijumčarenja. *Polic. Sigur.*, 2019, 28 (4), 517-541.



Dusautoir R, Zarcone G, Verrielle M, Garçon G, Fronval I, Beauval N, Allorge D, Riffault V, Locoge N, Lo-Guidice JM, Anthérieu S. Comparison of the chemical composition of aerosols from heated tobacco products, electronic cigarettes and tobacco cigarettes and their toxic impacts on the human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J. Hazard. Mater.*, 2021, vol. 401.

Ferreira SLC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AS, dos Santos WNL. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 597 (2), 179-186.

Hanafin J, Clancy L. History of tobacco production and use. *Prog. Respir. Res.*, 2015, 42, 1-18.

Hossain AM, Salehuddin SM. Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Arabian J. Chem.*, 2013, 6 (3) 275–278.

Hukkanen J, Jacob P, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(1), 79-115.

International Validation Of Analytical Procedures Q2(R2), 2022, <https://www.ich.org> pristupljeno 1.7.2022.

Langenheim JH. Plant Resins. *Am. Sci.*, 1990, 78 (1), 16-24.

Leffingwell JC. Leaf Chemistry: Basic Chemical Constituents of Tobacco Leaf and Differences among Tobacco Types. U: Tobacco:Production, Chemistry and Technology. Layten Davis D, Nielson MT, urednici, Wiley-Blackwell, 1999, str. 265-284.

Lisfroth G. Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat. Res.*, 1989, 222, 73-80.

Nigović B, Jurišić-Grubešić R, Vuković J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova - Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2014, str. 135-138.

Patel PH, Conrad KL, Pathiranage AL, Hiatt LA. Practical Applications of Organic Chemistry: Improving Student Knowledge of GC–MS through Qualitative Analysis of Nicotine in Electronic Cigarette Vapors. *J. Chem. Educ.*, 2020, 97 (11), 4117-4122.

Podjela duhana, 2011,

<https://web.archive.org/web/20150526023956/http://www.hrvatskiduhani.hr/duhani/o-duhanu.php>

Settle FA. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. New Jersey, Simon and Schuster, 1998, str. 609-624.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. Cengage Learning, 2013, str. 190.

Șpaiuc D, Șpac A, Agoroaei L, Butnaru E. Nicotine Determination from tobacco by GC/MS. *Farmacia*, 2014, 62 (5), 982-990.

Validacija analitičkih metoda, 2006, <https://www.hmd.hr/>, pristupljeno 30.6.2022.

Zubović J, Ljumović I, Jovanović O, Bodroža D, Domazet I, Vladislavljević M, Đukić M. Accelerating Progress on Effective Tobacco Tax Policies in Low-and Middle-Income Countries Economics of Tobacco and Tobacco Taxation. Beograd, Institut ekonomskih znanosti, 2019.

Žvorc D, Purić-Hranjec M, Varga A, Pintarić L. Instrumentizacija u analitici održivoga razvoja; Plinska kromatografija-masena spektrometrija GC-MS. Stručni rad, 2021.

## 7. SAŽETAK/ SUMMARY

Duhan, *Nicotiana tabacum*, porodice *Solanaceae*, jedan je od najčešće konzumiranih sredstava u gode i ovisnosti, najčešće pušenjem. Razlog njegove ovisnosti je nikotin, kao jedan od glavnih sastojaka samoga duhana. Ovisno o vrstama duhana kao što su Virginia, Burley, Maryland ili Oriental, ovisit će i koncentracija nikotina u duhanu. Nikotin djeluje na nikotinske acetilkolinske receptore (nAChR) stvarajući ovisnost, ali i brojne fiziološke te patofiziološke učinke. Često ilegalno trgovanje duhanom, kao i njegova uzročnost brojnih požara, uz brojne druge razloge, dovode do potrebe optimizacije metode kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu. Tako je metoda pripreme uzoraka duhana za kvantitativno određivanje nikotina u duhanu optimizirana Box-Behnkenovim dizajnom temeljenim na metodi odzivne površine. Korištenjem tri varijable u spomenutom dizajnu, udjela metanola u otapalu za ekstrakciju, vremena soniciranja te broja ekstrakcija, dobivene su optimalne vrijednosti navedenih parametara za pripremu uzoraka duhana. Kvantitativno određivanje nikotina odrađeno je pomoću plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) koja je validirana provjerom brojnih validacijskih parametara te zadovoljila postavljene kriterije prihvatljivosti. Razvijena metoda pokazala se prikladnom za navedenu svrhu kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu te će se moći koristiti u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, MUP-a RH.

Tobacco, *Nicotiana tabacum*, *Solanaceae*, is one of the most widely used stimulants and addictive substances, consumed mainly by smoking. The reason for its addictive nature lies in nicotine, one of the main components of tobacco. Depending on the type of tobacco, such as Virginia, Burley, Maryland or Oriental, the nicotine concentration in tobacco also varies. Nicotine is a substrate of nicotine acetylcholine receptors (nAChR), which are addictive and cause many other physiological and patophysiological effects. Illegal tobacco and its causality in numerous fire incidents, among many other reasons, have led to the need to optimize the method of quantitative analysis of nicotine in tobacco. The method of preparing tobacco samples for quantitative analysis of nicotine in tobacco was optimized by Box-Behnken design based on response surface modeling (RSM). In this design, three parameters were used, namely the percentage of methanol in the extraction solution, the duration of sonication, and the number of extractions for which optimal results were obtained, which were then used to prepare the tobacco samples. The quantitative analysis of nicotine in tobacco samples was performed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry which was validated by checking numerous validation parameters that met the established acceptance criteria. The method was thus found to be suitable for the quantitative analysis of nicotine in tobacco and will be used at the Ivan Vučetić Forensic Science Center in Zagreb, Croatia.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitičku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### OPTIMIZACIJA METODE ZA KVANTIFIKACIJU NIKOTINA U DUHANU PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM SA SPEKTROMETRIJOM MASA

Marko Marić

#### SAŽETAK

Duhan, *Nicotiana tabacum*, porodice *Solanaceae*, jedan je od najčešće konzumiranih sredstava ugođe i ovisnosti, najčešće pušenjem. Razlog njegove ovisnosti je nikotin, kao jedan od glavnih sastojaka samoga duhana. Ovisno o vrstama duhana kao što su Virginia, Burley, Maryland ili Oriental, ovisit će i koncentracija nikotina u duhanu. Nikotin djeluje na nikotinske acetilkolinске receptore (nAChR) stvarajući ovisnost, ali i brojne fiziološke te patofiziološke učinke. Često ilegalno trgovanje duhanom, kao i njegova uzročnost brojnih požara, uz brojne druge razloge, dovode do potrebe optimizacije metode kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu. Tako je metoda pripreme uzoraka duhana za kvantitativno određivanje nikotina u duhanu optimizirana Box-Behnkenovim dizajnom temeljenim na metodi odzivne površine. Korištenjem tri varijable u spomenutom dizajnu, udjela metanola u otapalu za ekstrakciju, vremena soniciranja te broja ekstrakcija, dobivene su optimalne vrijednosti navedenih parametara za pripremu uzoraka duhana. Kvantitativno određivanje nikotina odrađeno je pomoću plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) koja je validirana provjerom brojnih validacijskih parametara te zadovoljila postavljene kriterije prihvatljivosti. Razvijena metoda pokazala se prikladnom za navedenu svrhu kvantitativnog određivanja nikotina u duhanu te će se moći koristiti u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“, MUP-a RH.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 55 stranica, 27 grafičkih prikaza, 16 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: duhan, nikotin, plinska kromatografija sa spektrometrijom masa, Box-Behnken, optimizacija metode

Mentor: **Izv.prof. dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Komentor: **Dr. sc. Ivana Bačić, dipl. ing.**, *glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"*

Ocjenjivači: **Izv.prof. dr. sc. Jasna Jablan**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Ivana Bačić, dipl. ing.**, *glavni vještak za požare i eksplozije, Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja "Ivan Vučetić"*

**Doc. dr. sc. Maja Bival Štefan**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### METHOD OPTIMIZATION FOR QUANTIFICATION OF NICOTINE IN TOBACCO BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Marko Marić

#### SUMMARY

Tobacco, *Nicotiana tabacum*, *Solanaceae*, is one of the most widely used stimulants and addictive substances, consumed mainly by smoking. The reason for its addictive nature lies in nicotine, one of the main components of tobacco. Depending on the type of tobacco, such as Virginia, Burley, Maryland or Oriental, the nicotine concentration in tobacco also varies. Nicotine is a substrate of nicotine acetylcholine receptors (nAChR), which are addictive and cause many other physiological and pathophysiological effects. Illegal tobacco and its causality in numerous fire incidents, among many other reasons, have led to the need to optimize the method of quantitative analysis of nicotine in tobacco. The method of preparing tobacco samples for quantitative analysis of nicotine in tobacco was optimized by Box-Behnken design based on response surface modeling (RSM). In this design, three parameters were used, namely the percentage of methanol in the extraction solution, the duration of sonication, and the number of extractions for which optimal results were obtained, which were then used to prepare the tobacco samples. The quantitative analysis of nicotine in tobacco samples was performed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry which was validated by checking numerous validation parameters that met the established acceptance criteria. The method was thus found to be suitable for the quantitative analysis of nicotine in tobacco and will be used at the Ivan Vučetić Forensic Science Center in Zagreb, Croatia.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 55 pages, 27 figures, 16 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: tobacco, nicotine, gas chromatography-mass spectrometry, Box-Behnken, method optimization

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Ivana Bačić, Ph.D.**, *Chief Expert for Fire and Explosions*, Forensic Science Centre „Ivan Vučetić“

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ivana Bačić, Ph.D.**, *Chief Expert for Fire and Explosions*, Forensic Science Centre „Ivan Vučetić“

**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.