



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de nicotina en productos del tabaco
(Química Analítica)

TRABAJO FIN DE GRADO

Andrés Mosquera Vallín

Oviedo, Junio 2024

*“Me gusta mucho fumar,
pero me gusta más vivir.
Los muertos tampoco fuman”*

Joaquín Sabina

Agradecimientos:

A mis padres, por su constante apoyo en esta etapa universitaria.

A mi tutor, Jörg Bettmer, por su ayuda, dedicación y paciencia durante todo este trabajo.

A mis compañeros y amigos Javier, Jaime y Chus, por sus buenos consejos y amistad.

Índice

1.	Resumen	1
2.	Introducción.....	1
3.	Objetivos.....	6
4.	Metodología experimental	7
4.1	Reactivos	7
4.2	Instrumentación	7
4.3	Procedimiento operativo.....	7
4.3.1	Patrones estándar y recta de calibrado.....	7
4.3.2	Determinación de nicotina	8
5.	Resultados.....	9
5.1	Recta de calibrado	9
5.2	LOD y LOQ.....	12
5.3	Concentración de nicotina en el tabaco	12
5.4	Discusión de los resultados	15
5.4.1	Uso del Patrón Interno	15
5.4.2	Estudio del uso del reactivo PSA	18
5.4.3	Niveles de nicotina en los tabacos	19
6.	Conclusiones.....	21
7.	Bibliografía	22
7.1	Recursos web.....	22
7.2	Figuras	24
8.	Anexos.....	25
8.1	Cálculo de LOD y LOQ.....	25

1. Resumen

Este trabajo de fin de grado aborda la importancia de la determinación de los niveles de nicotina presentes en productos del tabaco, tanto desde un punto de vista químico como sanitario. Dado que este compuesto genera una gran adicción y graves perjuicios en la salud de las personas que lo consumen, su estudio y control resulta de gran interés. Concentraciones elevadas de nicotina en el cuerpo humano pueden derivar en un sobre estímulo de ciertas zonas sensoriales del cerebro, generando una elevada dependencia. Por ello, el análisis de este compuesto químico se puede realizar siguiendo diversos métodos, algunos muy conocidos como puede ser el caso de la cromatografía de gases, y otros algo menos, como el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, Sencillo, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro). Destacan aquellos que tienen buena sensibilidad, selectividad, eficacia y rapidez.

El estudio realizado se focaliza en el análisis de diferentes marcas industriales de tabaco, en forma de cigarrillos.

2. Introducción

Uno de los mayores problemas de la sociedad actual es la adicción generada por el tabaquismo, es decir, del consumo de productos con tabaco. Fumar este producto es perjudicial para la salud ya que incrementa la posibilidad de padecer, entre otras, enfermedades respiratorias, cardiovasculares y la aparición de tumores que pueden derivar en cánceres. Además, el tabaco contiene una sustancia, la nicotina, que genera una gran adicción y dependencia al acto de fumar ¹.

La nicotina del tabaco proviene de la planta *Nicotiana tabacum*, una planta originaria de América, usada a menudo con motivos medicinales y estimulantes. No fue hasta 1820, con el auge de las grandes empresas tabacaleras, cuando se aisló la molécula de nicotina por el médico Wilhelm Heinrich Posselt y por el químico Karl Ludwig Reinmann, ambos alemanes, quienes calificaron al compuesto como un veneno ². A partir de ese momento, se empezó a tejer una legislación en contra del consumo de tabaco para menores debido a la gran adicción que generaba. Actualmente existe una legislación muy estricta contra el tabaco para prevenir el tabaquismo entre la población.

La nicotina es un compuesto químico perteneciente a la familia de los alcaloides. Se encuentra principalmente en las plantas de tabaco y, en menor medida, en alimentos como tomates y patatas. Es

considerado un compuesto tóxico, altamente adictivo, siendo el principal ingrediente psicoactivo de cigarrillos, cigarrillos electrónicos, cigarros y otros compuestos con tabaco.

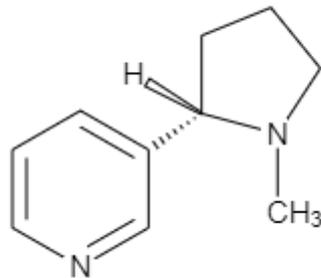


Figura 1. Molécula de la nicotina [1]

La nicotina estimula la producción de dopamina, un neurotransmisor del sistema nervioso que genera estímulos nerviosos en el cerebro y de vital importancia en el carácter del ser humano. La dopamina es biosintetizada a partir del aminoácido L-Tirosina, presente en diferentes proteínas ³.

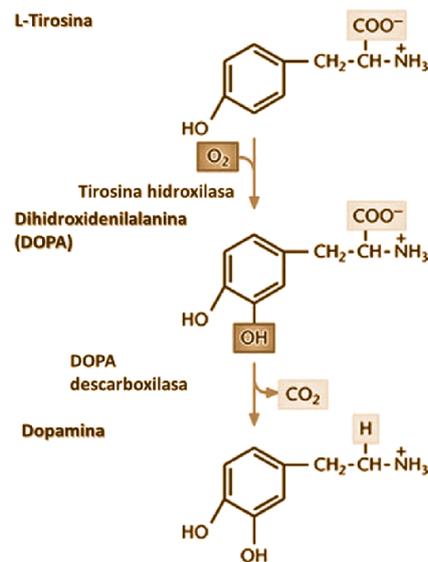


Figura 2. Reacción de obtención de la dopamina a partir de la L-Tirosina. [2]

Funciones como el comportamiento, las capacidades sociales y el aprendizaje, entre otras, dependen de las señales generadas por la dopamina. Generar una sobrecarga de los receptores dopaminérgicos provoca una sensación de bienestar y de placer. Aquí es donde se genera la dependencia a la sustancia. Los receptores se acostumbran a las cantidades desmedidas de dopamina generadas por la acción de consumir productos con tabaco y, los estímulos que no incluyan el consumo indirecto de nicotina, pasan a ser de menor importancia ya que no generan la misma cantidad de dopamina ⁴.

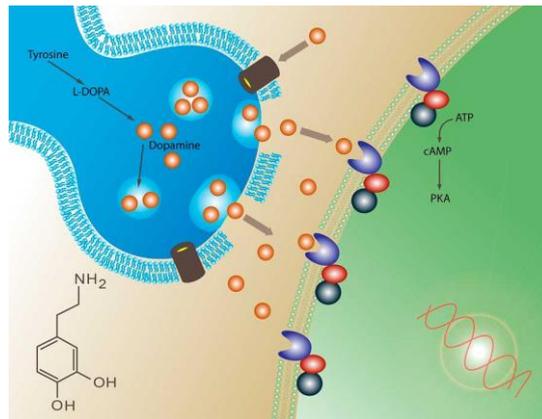


Figura 3. Esquema del proceso de transmisión de dopamina. [3]

Los resultados del consumo de nicotina se pueden explicar como un proceso de “descalibrado” de los receptores dopaminérgicos que no son capaces de detectar la concentración normal de dopamina, sino que dependen de la nicotina para la formación de dopamina en exceso. En resumen, se necesita una mayor cantidad de dopamina para generar la misma señal nerviosa que se generaría en situaciones normales ⁴.

Por lo tanto, el consumo de tabaco no solo daña el cuerpo y sus órganos, sino que también genera una dependencia elevada, haciendo que las personas tengan graves problemas para dejar de fumar. Al intentarlo, sufren síndromes de abstinencia caracterizados por dificultad para conciliar el sueño; pérdida de concentración en la realización de cualquier tipo de actividad; cambios repentinos del humor; dolores de cabeza y otros efectos⁴.

Dado que el consumo del tabaco genera tales daños en el sujeto que lo consume, a lo largo de los años se ha legislado para controlar la producción y venta de estos productos. El Real Decreto 597/2017, de 9 de junio, por el que se regulan determinados aspectos relativos a la fabricación, presentación y comercialización de los productos del tabaco y los productos relacionados, obliga a las empresas distribuidoras a proporcionar la lista de los ingredientes usados y su concentración. En el caso de los cigarrillos, no podrán tener niveles de emisión de más de 1 miligramo de nicotina. Además, incluirán la información toxicológica de cada uno de los ingredientes y mostrarán en el embalaje mensajes de todos los peligros que se pueden derivar de fumar ⁵.

Aunque esta normativa regula la cantidad de nicotina que puede ser emitida al organismo los cigarrillos contienen una mayor concentración de este compuesto, situándose en un rango de entre 6 y 12 mg de media ⁶. Esta concentración varía dependiendo de la marca y tipo de tabaco.

Una vez visto todo lo anterior, es necesario realizar un seguimiento exhaustivo de los niveles de nicotina en productos que contengan tabaco. Para ello, se tiene que emplear un método analítico que sea

sensible en un rango amplio de concentraciones, exacto en sus medidas, reproducible, sencillo, rápido de manejar y que sea relativamente barato. Por ello se estudian diversos métodos para llevar a cabo este análisis.

El primero de los métodos consiste en realizar una medición del pH, seguido de una extracción para luego realizar un análisis con cromatografía de gas – espectrometría de masas (GC-MS) ⁷

La nicotina tiene varias posiciones que, al tratarse con un ácido orgánico o inorgánico, captan hasta 3 protones para formar sales. Mediante la medición del pH de la disolución con la que se trata la muestra de tabaco, se puede determinar, empleado la fórmula de Henderson-Haselbach, la concentración de las distintas formas de la nicotina: en estado libre, en estado protonado simple o en estado protonado doble.

Este método se basa en la diferencia de solubilidad de las diferentes formas de la nicotina en función de si está protonada o no. Dependiendo de su pH, se elige un tipo de extracción.

Hay dos formas de realizar la extracción. La primera se hace directamente con agua (desionizada o destilada) para luego ser extraída con un disolvente orgánico adecuado. La segunda forma se basa en realizar los mismos pasos solo que a la inversa: tratar la muestra con un disolvente orgánico para luego realizar una extracción y purificación con agua.

Una vez extraída la nicotina de la muestra se lleva a cabo el análisis en GC-MS. La cromatografía de gases realiza una separación mediante la volatilización de los distintos compuestos que pueda contener el tabaco a parte de la nicotina. Estos compuestos son arrastrados por un gas (fase móvil) a lo largo de una columna (fase estacionaria). Dependiendo de la intensidad de interacción que tengan los distintos analitos con esta columna quedarán más o menos retenidos en ella, obteniendo la separación de los compuestos.

Por otra parte, el espectrómetro de masas determina la composición de los diferentes compuestos químicos analizando su relación masa/carga. Se emplea como detector para analizar los compuestos separados en la cromatografía de gases.

Un segundo método para la determinación de nicotina es el uso del método QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Rápido, Sencillo, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro) ⁸

Esta técnica fue ideada inicialmente por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (FDA) para el análisis de pesticidas en plantaciones. Hoy en día es usado para analizar gran cantidad de compuestos de forma rápida y sencilla.

Este método combina una fase de extracción empleando diferentes reactivos (dependiendo de las características del analito a analizar). Es común usar acetonitrilo y una serie de sales, como cloruro sódico, sulfato de magnesio, acetato de sodio o sales de citrato. La siguiente etapa consiste en una dispersión en fase sólida, que permite “limpiar” la muestra de agua o de compuestos que no se quieren analizar para obtener resultados más precisos. Se suele emplear carbón activo y sulfato de magnesio.

Una vez limpia la muestra, se realiza una centrifugación para obtener un extracto que se analiza posteriormente. En el caso de la nicotina se emplea la cromatografía de gas con detector de ionización de llama (FID = Flame Ionization Detector) como detector.

Otro método por mencionar es la determinación de nicotina mediante microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME = Headspace-Solid Phase Microextraction) con un sistema GC-MS⁹. Es una variante del primer método ya que utiliza la extracción directa, en su versión micro, de la nicotina en el tabaco.

La microextracción en fase sólida utiliza una jeringa con una aguja compuesta de una fibra recubierta de una fase extractora, que puede ser sólida, líquida o un mixto entre ambas. Cuando la aguja entra en contacto con la muestra, el analito queda retenido en la fibra debido a los principios de adsorción/absorción, dependiendo si la muestra es sólida o líquida. La jeringa es inyectada directamente al cromatógrafo de gases para realizar los análisis.

Un último método para determinar nicotina está basado en la cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC-MS = Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)¹⁰

Este método es capaz de separar los diferentes compuestos presentes en una muestra pasando una fase móvil a través de una fase estacionaria. Las moléculas interaccionan con ambas fases y, dependiendo de su afinidad por ellas, quedan retenidas en menor o mayor grado. Estas fases pueden variar dependiendo de los compuestos que se quieran separar (basándose en la polaridad de las sustancias).

Una vez separados los distintos componentes de la muestra, estos se analizan con un sistema de espectrofotometría de masas. Su fundamento consiste en disolver el analito en un compuesto más volátil que él y hacerlo pasar por un capilar muy pequeño al cual se le aplica un potencial eléctrico. Se genera una “nube” de gotas altamente cargadas, producidas por la ionización del analito.

Una vez vistos estos métodos se procede a estudiar las ventajas, las desventajas y los límites de detección de cada uno de ellos, representados en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Representación de las ventajas, desventajas y límites de detección de los distintos métodos de análisis.

	Extracción GC-MS	Quechers GC-FID	HS-SPME GC-MS	LC-MS
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificación de varios analitos a la vez. - Capaz analizar una gran variedad de analitos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados exactitud. - Tiempo de análisis bajo. - Equipo/reactivos baratos (para Quechers solo) - Análisis muy sencillo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Automatización (rapidez de análisis) - Capaz analizar una gran variedad de analitos. - No requiere la derivatización de la muestra. - Análisis sencillo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Resultados exactitud. - Cuantificación de varios analitos a la vez. - Alta sensibilidad y selectividad.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Coste del equipo y su mantenimiento. - Tiempos de análisis elevados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los analitos deben de ser volátiles. - No adecuado para compuestos inorgánicos. - Baja selectividad comparado con MS. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coste del equipo muy elevado (fibras muy específicas) - Los analitos deben de ser volátiles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Coste del equipo y su mantenimiento. - Se requieren fases móviles muy puras.
Límites de detección	5300 ng/g ⁷	$6 \cdot 10^5 - 25 \cdot 10^5$ ng/L ⁸	840 ng/g ⁹	300 – 2000 ng/L ¹⁰

Los límites de detección han sido obtenidos directamente de las publicaciones presentes en la bibliografía.

Habiendo estudiado las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos se decide usar el método Quechers debido a su sencillez, bajo coste de los reactivos y a su rapidez de análisis. Además, la nicotina es un compuesto volátil que puede ser analizado en GC-FID.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la determinación de la concentración de nicotina en productos del tabaco, como por ejemplo bolsas de tabaco de liar, y comparar los datos obtenidos con la información del fabricante. Para ello se estudian diferentes métodos y se elige el más conveniente (método Quechers). Otros objetivos son la observación de las diferentes características de la molécula de nicotina; la exposición de los problemas de salud causados por el consumo del tabaco y cómo se genera una dependencia debido a este químico.

4. Metodología experimental

4.1 Reactivos

- Acetonitrilo.
- Carbonato de potasio (K_2CO_3)
- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- Cloruro sódico (NaCl)
- Amina primaria/secundaria (PSA), en tubos de extracción en fase sólida, obtenidos de la empresa Sigma Aldrich con referencia Supelclean™ PSA SPE Tube (nº producto 52578-U)
- Patrón estándar de nicotina, obtenida de la empresa Sigma Aldrich con referencia PESTANAL™, analytical standard (nº producto 36733)
- Quinolina para Patrón Interno, obtenida del Laboratorio de Investigación de Orgánica de la Universidad de Oviedo.
- Tabaco (bolsas de tabaco de liar) marca Horizon, Pueblo y Virginia Flandria.

4.2 Instrumentación

- Cromatógrafo de Gas Shimadzu GC-2025 con columna Teknokroma (Fase TR-CN100, 50 m, 0'25 mm ID, 0'2 DF) y detector FID.
- Centrifugadora Thermo Biofuge Stratos.
- Vortex VELP Scientifica ZX3.

4.3 Procedimiento operativo

Se preparan las siguientes disoluciones:

- Disolución patrón de nicotina de 200 ppm.
- Disolución de quinolina de 100 ppm, obtenida de una disolución stock de 1000 ppm.

4.3.1 Patrones estándar y recta de calibrado

La metodología experimental para la determinación de nicotina se lleva a cabo siguiendo el método Quechers con GC-FID⁸

La recta de calibrado se realiza a partir de patrones de nicotina, con concentraciones de 2'5; 5; 10 y 20 ppm obtenidos de una disolución de 200 ppm de nicotina en acetonitrilo. Como la medición se realiza

en un sistema GC-FID, es recomendable usar un patrón interno. En este caso se usa la quinolina, cuya forma estructural y temperatura de ebullición se asemejan a las de la nicotina. A cada una de estas disoluciones se le añade 10 μL de una disolución 100 ppm de quinoleína. Los patrones se inyectan en el sistema y se estudia el cromatograma de cada uno de ellos para recoger sus puntos y realizar la recta.

4.3.2 Determinación de nicotina

Las muestras que se van a analizar son bolsas de tabaco de liar comerciales de las marcas Horizon, Pueblo y Virginia Flandria. Todas las muestras han sido adquiridas en el mismo establecimiento, el Estanco N^o60 (C/Corrida 29, Gijón).



Figura 4. Muestras de los tabacos “Horizon”, “Virginia Flandria” y “Pueblo” analizados.

Las muestras son previamente secadas el día anterior al análisis, ya que el tabaco contiene un porcentaje significativo de agua que podría afectar a los resultados.

Para llevar a cabo el análisis se sigue este procedimiento: 0,6 g de muestra se colocan en un tubo de propileno de 15 mL. Se añaden 7,6 mL de acetonitrilo al tubo y se agita la mezcla. Después, se ajusta el pH a 12 añadiendo 500 μL de una disolución 1 M de K_2CO_3 . La mezcla se agita de nuevo y se añaden 1,4 g de MgSO_4 y 0,3 g de NaCl. El tubo se agita con vórtice durante 1 minuto y se centrifuga durante 5 minutos a 4000 rpm. Una vez realizado este proceso se obtiene un líquido sobrenadante. Se extraen 2 mL de este y se colocan en otro tubo que contiene 0,3 g de MgSO_4 . Posteriormente, se pasa el líquido a través de un cartucho de PSA mediante un sistema de vacío. Una vez hecho esto, el líquido se agita en un vortex y el líquido resultante se filtra con un filtro de nylon (0,22 μm). Se trasfiere a un vial para ser determinado en el sistema GC-FID.

El siguiente paso es la preparación del sistema GC-FID. Se deben de establecer ciertas condiciones para la medición de la muestra. El horno se inicia a una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ que se mantiene durante 1

minuto. Se aumenta la temperatura hasta 280 °C, con un gradiente de 40 °C/minuto y se mantiene durante 2,5 minutos.

El inyector y el detector se mantienen a 230 °C y a 250 °C, respectivamente. Se usa helio como gas portador y el volumen de inyección es de 2 µL en modo Split.

5. Resultados

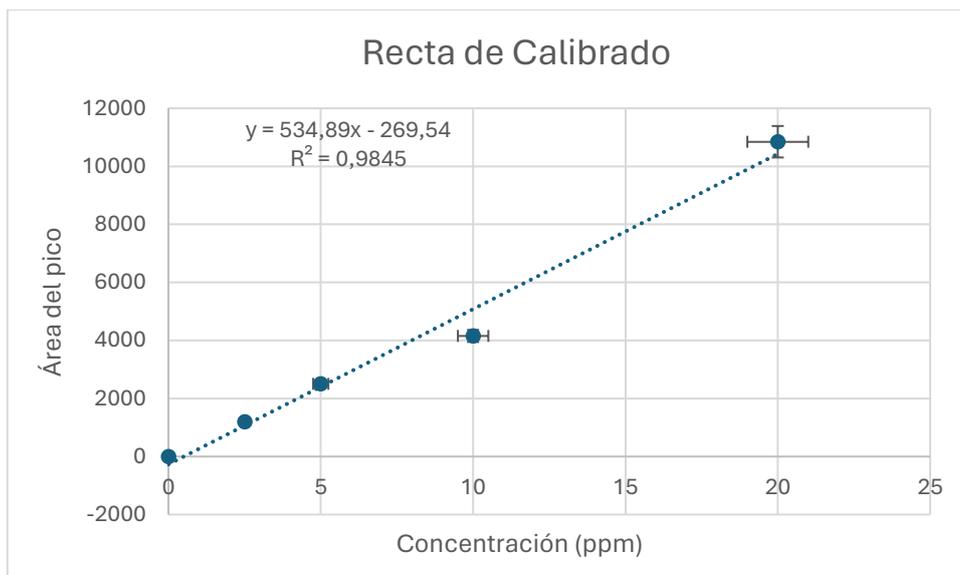
5.1 Recta de calibrado

Se realiza la recta de calibrado tomando los patrones estándar mencionados en el apartado 4.3.1. Se preparan disoluciones de 1 mL de concentraciones crecientes (0; 2,5; 5; 10 y 20 ppm). Se toman 2 µL de cada disolución y se llevan al sistema GC-FID. El análisis se realiza por triplicado.

La recta obtenida es la siguiente $A = 534,89 [C] - 269,54$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9845$. Estos resultados vienen representados en la *Gráfica 1* y en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Representación de las áreas obtenidas frente a la concentración del patrón (ppm) y la desviación estándar.

Concentración (ppm)	Área del pico	Desviación estándar
0	0	0
2,5	1200,1	60,5
5	2506,2	163,7
10	4156,7	316,8
20	10847,8	1278



Gráfica 1. Calibrado para los patrones de nicotina. Representación de las áreas de los picos frente a las concentraciones de los patrones (ppm)

Un ejemplo de los cromatogramas obtenidos a la hora de realizar la recta de calibrado se muestra en las Figuras 5 y 6 además del blanco, representado en la Figura 7. En ellas se representan los cromatogramas para la concentración de 2,5 ppm y 20 ppm. Como se puede observar, la nicotina tiene un pico bien definido que aparece a un tiempo de retención de 5,1 minutos.



Figura 5. Cromatograma obtenido de la medición del primer análisis del patrón 2,5 ppm. El pico marcado corresponde a la nicotina.

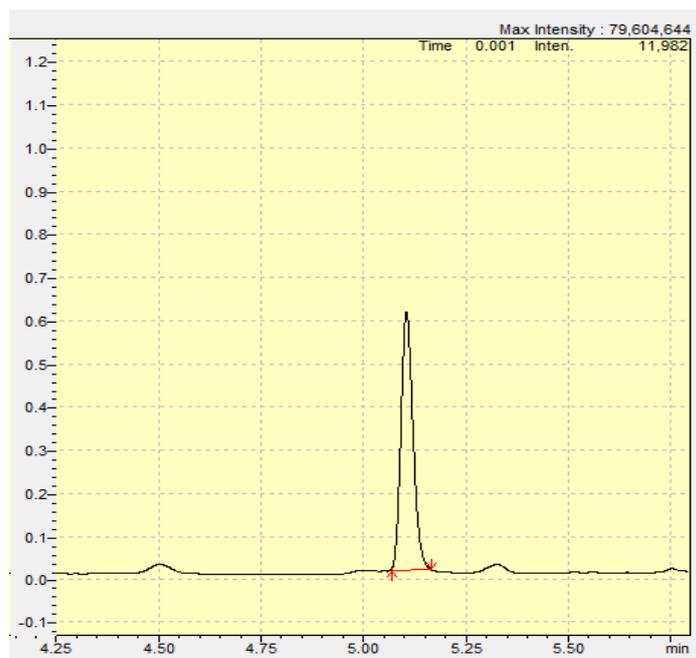


Figura 6. Cromatograma obtenido de la medición del primer análisis del patrón 20 ppm.

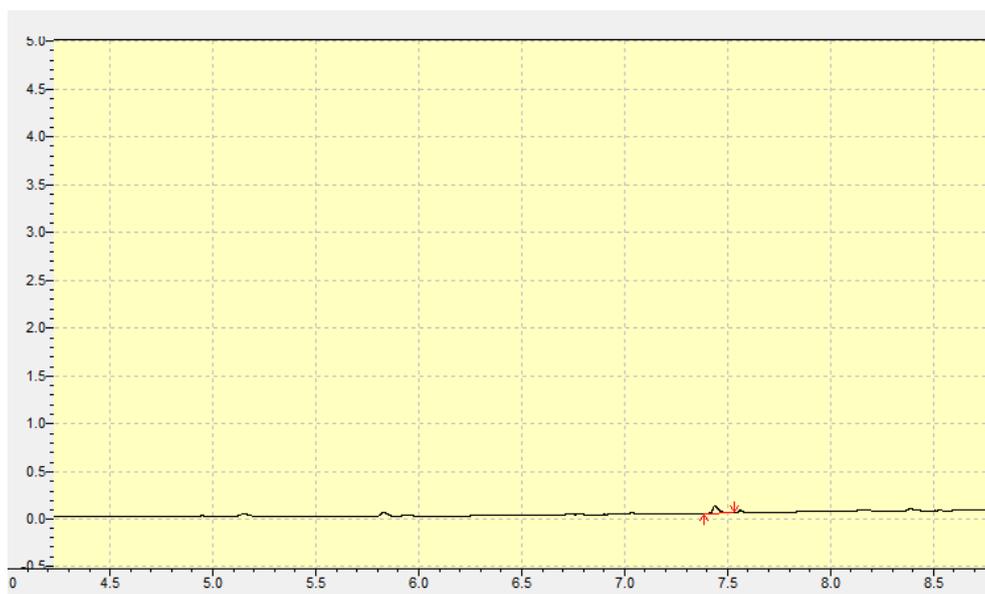


Figura 7. Cromatograma obtenido de la medición del blanco N° 1.

5.2 LOD y LOQ

Para calcular los límites de detección (LOD = Limit Of Detection) y de cuantificación (LOQ = Limit Of Quantification) se hace uso de las *Ecuaciones 1 y 2* siendo m la pendiente de la recta de calibrado y S_B la desviación estándar de la pendiente para ambas ecuaciones. Para obtener los valores de LOD y de LOQ se sustituye el resultado obtenido en la recta de regresión representada en la *Gráfica 1*. Estos valores se expresan en unidades de concentración (ppm).

$$LOD = \frac{3S_B}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$LOQ = \frac{10S_B}{m} \quad \text{Ecuación 2}$$

Para calcular la desviación estándar del blanco se integra el área comprendida entre 5,2 y 5,4 segundos de los cromatogramas correspondientes a la medida del blanco. Una vez obtenidos los datos se realiza el cálculo de la desviación estándar de forma normal.

Los valores obtenidos son: LOD = 0,9 ppm y LOQ = 3,1 ppm. Los cálculos están detallados en el apartado *Ánexo 1*.

5.3 Concentración de nicotina en el tabaco

La obtención de la cantidad de nicotina en las diferentes marcas de tabaco comienza por determinar la concentración del analito en la disolución final, una vez acabado el tratamiento de la muestra.

Se ha realizado un estudio de tres marcas de tabaco: Horizon, Pueblo y Flandria Virginia. Primero se representa el contenido en agua de cada muestra de tabaco (*Tabla 3*). Es necesario recordar que el secado de la muestra es de vital importancia para que el agua no interfiera en el posterior cromatograma. Después se representan los valores obtenidos de las concentraciones de la nicotina en las muestras de tabaco (*Tabla 4*); las áreas de los picos obtenidos; las concentraciones en las diluciones y la media de las concentraciones finales. Las concentraciones (diluciones y finales) se obtienen de sustituir las áreas de pico en la recta de calibrado (*Gráfica 1*).

Tabla 3. Representación del porcentaje de agua en las diferentes marcas de tabaco

Muestra	Muestra sin secar (g)	Muestra secada (g)	Porcentaje agua (%)
Horizon	5,1	4,4	14
Pueblo	7,6	6	20,4
Virginia Flandria	9,7	7,1	26,3

Tabla 4. Representación de las concentraciones de nicotina (en dilución y en la muestra original) frente a su área de pico.

Muestra	Área de pico	Concentración (dicon muestra) (ppm)	Concentración (muestra) (ppm)	Media (ppm)
Horizon	66157,6	504,8	70,5	55 ± 8
	38594,9	445,5	41,8	
	48499	405,7	53	
Pueblo	51279,3	212	55,8	72 ± 8
	74243,3	300,1	79	
	76143,5	311,1	81,9	
Virginia Flandria	136106	268,1	132,8	120 ± 8
	116263,6	158,7	117,2	
	107413	201,2	106,8	

Realizando los cálculos pertinentes se obtienen las concentraciones de nicotina, expresadas en mg/g. Se toma como referencia 0,6 g que es el peso aproximado del tabaco en un cigarrillo.

- Horizon: 5,5 ± 0,8 mg/g
- Pueblo: 7,2 ± 0,8 mg/g
- Virginia Flandria: 11,9 ± 0,8 mg/g

En las Figuras 8, 9 y 10 vienen representados los cromatogramas de las diferentes muestras de tabaco.

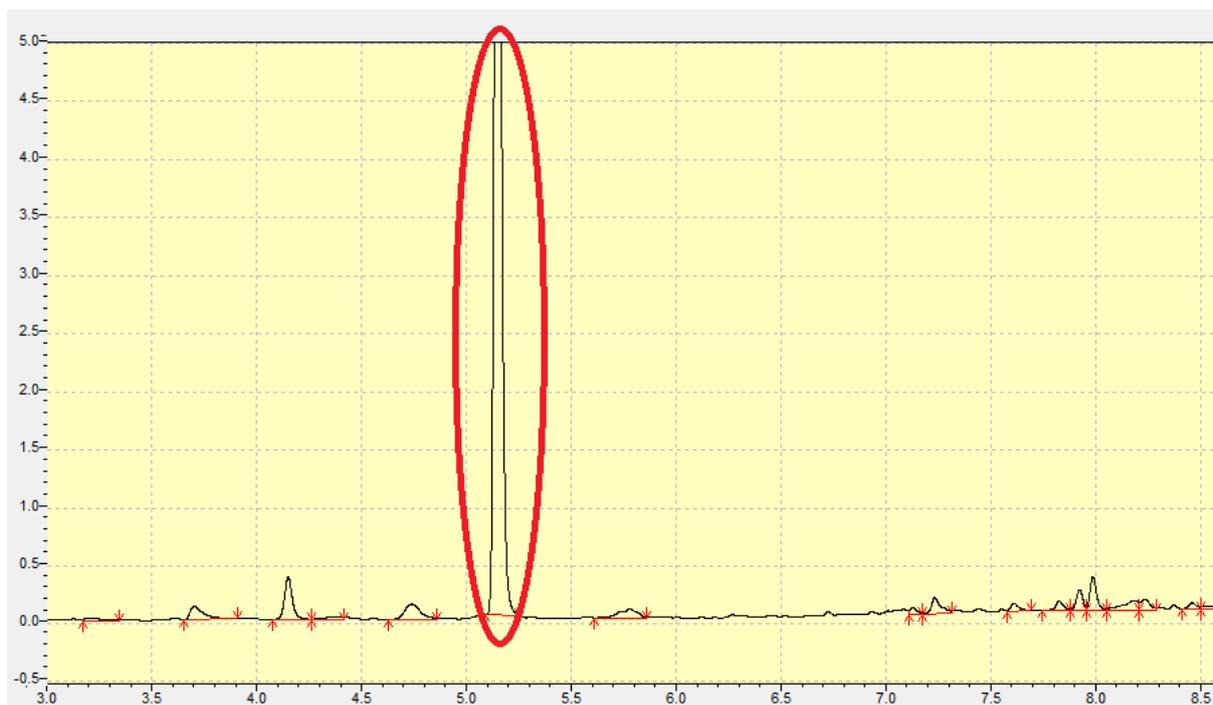


Figura 8. Cromatograma obtenido del análisis del tabaco Horizon. El pico marcado corresponde a la nicotina.

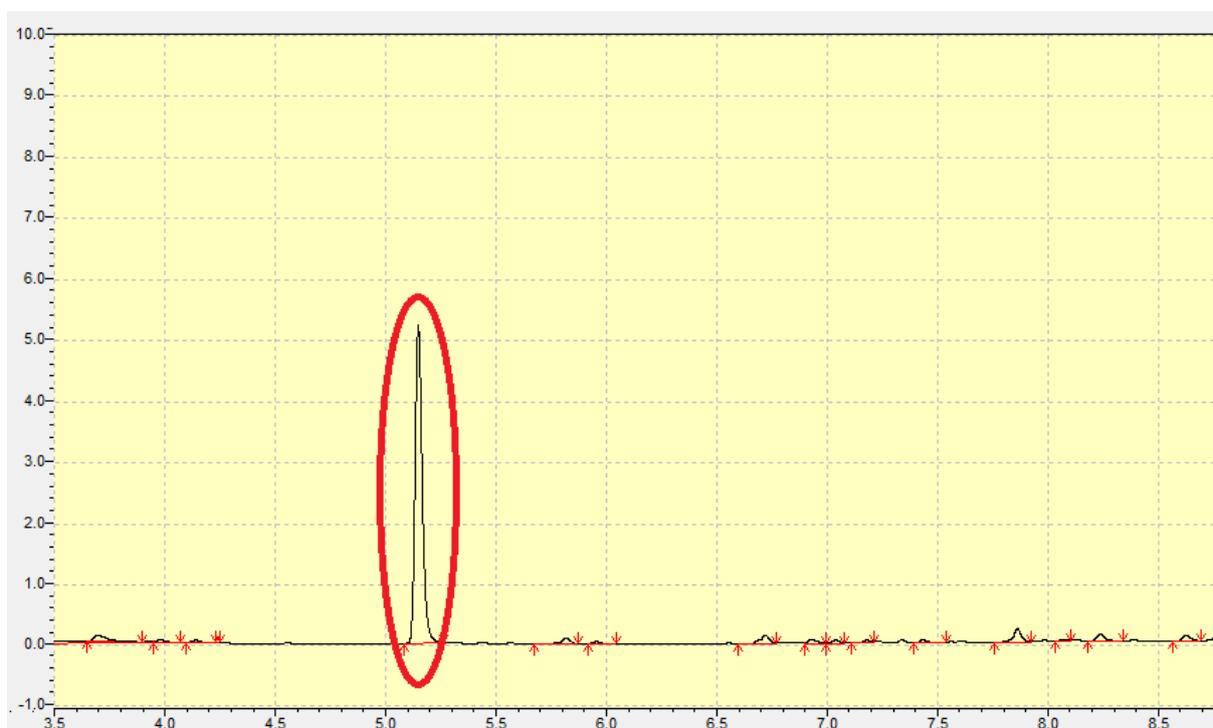


Figura 9. Cromatograma obtenido del análisis del tabaco Pueblo. El pico marcado corresponde a la nicotina.

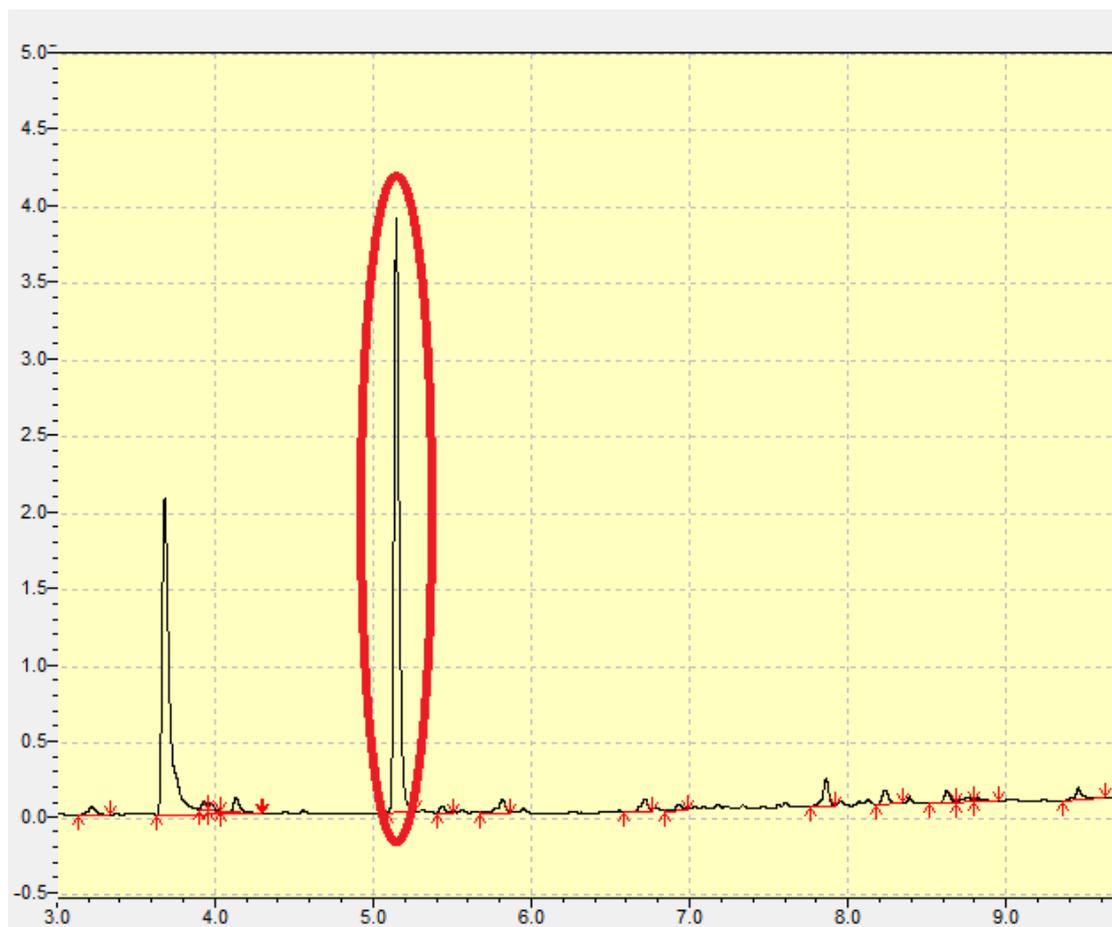


Figura 10. Cromatograma obtenido del análisis del tabaco Virginia. El pico marcado corresponde a la nicotina.

5.4 Discusión de los resultados

5.4.1 Uso del Patrón Interno

En mediciones con el sistema GC se recurre al uso de un patrón interno (PI) para mejorar la precisión y exactitud de las rectas de calibrado, obteniendo así resultados más fiables. En este ensayo se realizan dos rectas de calibrado, una con PI y otra sin él, para luego comprobar sus coeficientes de correlación (R^2) y sus desviaciones estándar.

En este trabajo se emplea la quinoleína (también llamada quinolina) como PI debido a su similitud estructural y a sus parecidos puntos de ebullición (237,2 °C para la quinoleína y 247 °C para la nicotina) Además, su tiempo de retención no se aleja demasiado del de la nicotina (5,1 min para la nicotina y 5,8 min para la quinoleína) por lo que el análisis no se alargará en exceso.

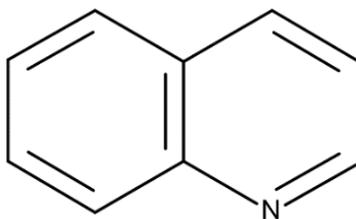


Figura 11: Estructura de la quinoleína [4]

Primero se estudió la recta de calibrado sin la adición del patrón interno cuyos datos ya están representados en la *Tabla 2* y *Gráfica 1*. Se calculan los RSD para las medias de las áreas obtenidas. Estas aparecen mostradas en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Representación de las RSD frente a las diferentes concentraciones de los patrones sin PI.

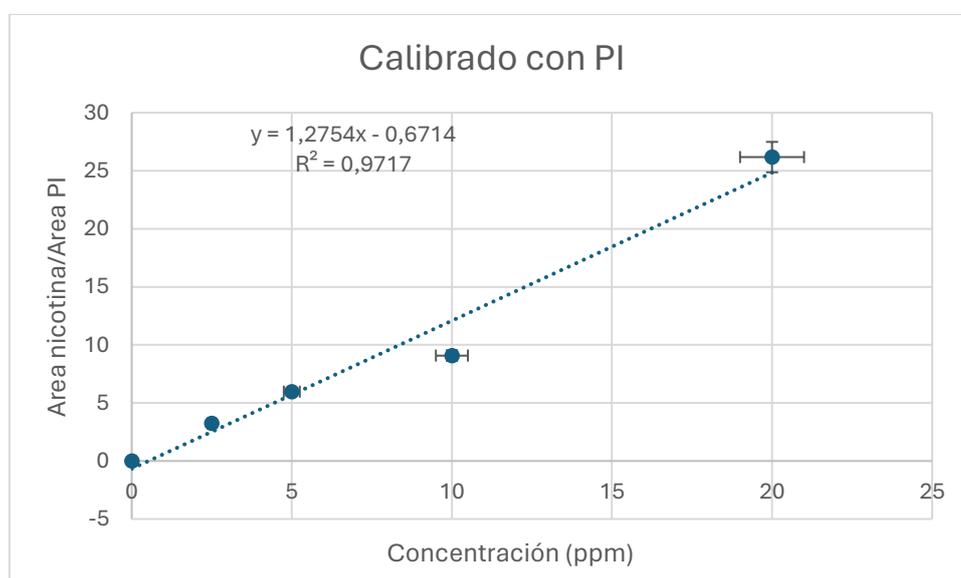
Concentración (ppm)	RSD
2,5	0,05
5	0,06
10	0,08
20	0,11

Se considera un valor aceptable de la RSD cuando es menor del 0,1. Se observa que en las concentraciones 2,5; 5 y 10 ppm los valores se encuentran dentro de este rango. Sin embargo, al llegar a 20 ppm, el RSD toma un valor del 0,113. Por ello, se estudia el uso del PI para intentar mejorar estos valores.

Se procede ahora a realizar el calibrado con el PI. Para ello, se toman las mismas concentraciones que en la recta sin PI, añadiendo a cada disolución de 1 mL del patrón 10 μ L de una disolución de 10 ppm de quinoleína obtenida, a su vez, de una disolución de 1000 ppm. Se pichan 2 μ L de cada disolución en el GC-FID. Las RSD de las medias de las áreas vienen representadas en la *Tabla 6*.

Tabla 6. Valores del calibrado de la nicotina con PI. Media de las áreas de pico de la nicotina entre las áreas de pico del PI (por triplicado) frente a las diferentes concentraciones de los patrones y sus RSD.

Concentración (ppm)	Media área nicotina/área P. I	RSD
2,5	3,2	0,19
5	6,0	0,11
10	9,1	0,23
20	26,2	0,28



Gráfica 2. Representación de las áreas nicotina / áreas P.I. frente a la concentración de los patrones (ppm)

En la recta de calibrado con PI se obtienen valores mucho más dispares. En los casos de 2,5 y 10 ppm las RSD son mucho más altas que en la recta de calibrado sin PI. Además, el valor del coeficiente de correlación es menor (sin PI es del 0,9845). Esto se traduce en una falta de precisión a la hora de realizar el calibrado y, por tanto, se podrían obtener valores erróneos en la concentración final de la nicotina en el tabaco.

Al realizar un análisis en el GC-FID de un blanco con 10 µL del PI y estudiando el cromatograma resultante (*Figura 12*), se encuentran bandas que corresponden a otros compuestos desconocidos.



Figura 12. Cromatograma del análisis de un blanco (acetonitrilo) con el PI. El pico marcado corresponde a la quinoleína.

Como se puede observar en la *Figura 12* aparece a 5,8 min el pico correspondiente a la quinoleína y, según avanza el tiempo, se observan otros picos de compuestos que son desconocidos. Por lo tanto, se empleará la recta de calibrado sin PI ya que, aun teniendo un valor de RSD alto (solamente a 20 ppm) los resultados tendrán un error asociado mucho menor.

5.4.2 Estudio del uso del reactivo PSA

El reactivo PSA es un adsorbente de extracción en fase sólida usado durante la segunda fase del tratamiento de la muestra, una vez realizado el centrifugado. En esta etapa se hace pasar el líquido sobrenadante para pasarlo a través de un cartucho con PSA mediante un sistema de vacío. Este reactivo se usa para eliminar, principalmente, los ácidos grasos de la muestra para que estos no generen interferencias en el posterior análisis.

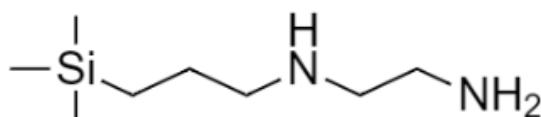


Figura 13. Estructura del reactivo PSA [5]

Durante el análisis de la muestra se comprobó que, al pinchar el líquido resultante, la altura del pico correspondiente a la nicotina era muy bajo en comparación con lo que se debería obtener. Se pueden comparar las dimensiones de los picos de los cromatogramas expuestos en las Figuras 8, 9 y 10 con la Figura 14. (La nicotina es el pico que aparece a 5,1 min).



Figura 14. Cromatograma del análisis del tabaco “Pueblo” tratado con PSA. La zona marcada representa donde debería de aparecer el pico de la nicotina.

Se observa la ausencia del pico de la nicotina a 5,1 minutos por lo que, para comprobar si el reactivo PSA afecta en el análisis, se decide realizar el mismo procedimiento con una nueva muestra de tabaco eliminando el paso donde se pasa el líquido sobrenadante por el cartucho de PSA, para comprobar si este reactivo está reteniendo la nicotina contenida en el tabaco.

Una vez realizado el procedimiento, se procede a inyectar el líquido resultante en el cromatógrafo. Esta vez se obtiene un pico mucho más alto, indicando que posiblemente el PSA retuviera parte de la nicotina de la muestra.

5.4.3 Niveles de nicotina en los tabacos

Una vez realizados los análisis, los resultados que se obtienen difieren de los esperados. Se toma como referencia el rango dado por la NIH (National Institutes of Health, Institutos Nacionales de Salud) del Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos ⁶, obtenido de un estudio de la

nicotina en tabacos nacionales, importados y de pipa. Este rango se encuentra entre 6 y 12 mg (aunque puede variar dependiendo del tabaco) por cigarrillo (cada cigarrillo contiene 0,6 g de tabaco). Las concentraciones finales de nicotina en las tres marcas de tabaco son muy diversas. Esto en un principio no debería de suponer un problema ya que, dependiendo del tabaco analizado, la cantidad de nicotina varía. Al calcular la cantidad de nicotina en la marca Horizon (5,5 mg/g) y la marca Pueblo (7,2 mg/g) se observa que están por debajo del promedio descrito. En el caso del tabaco Virginia la cantidad de nicotina se encuentra dentro de este rango, siendo de 11,9 mg/g.

No existe ningún etiquetado ni ninguna información en el paquete de tabaco que indique la cantidad de nicotina que contiene el producto, como se puede observar en la *Figura 4*, por lo que se hace muy difícil verificar esta concentración. Además, realizando una búsqueda de las páginas web de las tabacaleras^{11,12} que producen estas marcas, no se indica ninguna información sobre el contenido de nicotina, solamente especifican los procesos de cultivo y explotación.

En el caso de la marca Pueblo¹¹ la única información de relevancia que aporta la compañía tabacalera en su web es que tiene sus instalaciones en Baviera, Alemania y que cumplen con el sistema de Gestión de Calidad ISO 9001:2015. Lo mismo ocurre con la marca Virginia Flandria¹²

Esto demuestra la importancia de establecer una estricta legislación que regule la información obligatoria del producto, las sustancias presentes y sus concentraciones, además de los efectos adversos que puedan generar, para así garantizar la información del consumidor.

Por otro lado, se observa que en el cromatograma de la marca Virginia Flandria (*Figura 9*) aparece un pico muy intenso entre 3,5 y 3,6 segundos. En los cromatogramas de los otros tabacos aparece esa misma señal, pero no con esa altura, por lo tanto está presente en todas las muestras pero difiere en su concentración. Se puede pensar que sea agua ya que es el tabaco más húmedo de los tres (contiene un 26 % de agua) pero esta posibilidad se descarta ya que todas las muestras han pasado una noche secando antes de ser analizadas, por lo que es imposible que esté húmeda. Por lo tanto, es muy probable que sea un aditivo añadido. Hay varios ejemplos de aditivos que se añaden al tabaco de forma regular. Un ejemplo muy común de ellos es el amoníaco¹³, el cual aumenta la absorción de la nicotina. Otro ejemplo son los aditivos aromatizantes¹³ que añaden sabores adicionales al humo del tabaco.

Se debe de realizar un estudio para averiguar cuál es ese aditivo, estudiando cada uno de ellos de forma individual.

Cabe realizar una puntualización respecto al LOD y LOQ. Como se detalla en el *Anexo 1*, los valores de las integraciones de los blancos son elevadas por lo que, si bien el valor del LOD es válido, el valor LOQ es un poco elevado. Esto se puede deber a un error a la hora de realizar los blancos en el GC-FID.

6. Conclusiones

Este trabajo ha tenido como objetivo el estudio y la comprobación de los niveles de nicotina de tres marcas comerciales de tabaco a partir de un método QuEChERS modificado para poder determinar el analito de interés. Este ha sido capaz de alcanzar los objetivos establecidos por lo que el método podría ser aplicado para la determinación de nicotina en otros tipos/marcas de tabaco.

Como primera reflexión, el método ha resultado ser muy rápido a la hora de analizar un tamaño considerable de muestras. Por otra parte, la recta de calibrado mostrada en la *Figura 1* tiene un buen factor de determinación. Se descarta la recta de calibrado realizada con el patrón interno debido a sus valores elevados de RSD.

Por otro lado, y en cuanto al estudio de las muestras, los valores obtenidos son muy dispares entre sí, confirmando que la concentración de nicotina varía dependiendo de la marca de tabaco. Dos de las muestras analizadas (Horizon y Pueblo) tienen concentraciones muy bajas de nicotina comparadas con el promedio expuesto en la bibliografía, siendo la más aproximada la del tabaco Virginia.

Además, es necesario indagar más en la determinación de los componentes del tabaco Virginia, el cual presenta un compuesto en un alto porcentaje. De esta forma se podría desarrollar un listado completo de todos los ingredientes de esta marca que ofrezca una buena información al consumidor.

7. Bibliografía

7.1 Recursos web

1. Nicotine: Systemic agent. (2023, mayo 23). Cdc.gov. https://www.cdc.gov/niosh/ershdb/emergencyresponsecard_29750028.htm
2. Felman, A. (2021, 11 enero). Todo lo que debes saber acerca de la nicotina <https://www.medicalnewstoday.com/articles/es/nicotina#efectos>
3. Marsden, C. A. (2006). Dopamine: the rewarding years. *British Journal of Pharmacology*, 147(S1), S136. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706473>
4. Pozuelos Estrada, J., Martinena Padial, E., Monago Lozano, I., Viejo Durán, I., & Pérez Torralba, T. (2000). Farmacología de la nicotina. *Medicina Integral*, 35(9), 409–417. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-farmacologia-nicotina-11678>
5. BOE-A-2002-20273 Real Decreto 1079/2002, de 18 de octubre, por el que se regula los contenidos máximos de nicotina, alquitrán y monóxido de carbono de los cigarrillos, el etiquetado de los productos del tabaco, así como las medidas relativas a ingredientes y denominaciones de los productos del tabaco (s.f) <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2002-20273>
6. Taghavi, S., Khashyarmanesh, Z., Moalemzadeh-Haghighi, H., Nassirli, H., Eshraghi, P., Jalali, N., & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2012). Nicotine content of domestic cigarettes, imported cigarettes and pipe tobacco in Iran. *Addiction & Health*, 4(1–2), 28. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24494133/>
7. Li, L., Zhang, H., Wen, J., Shen, Y., Li, D., Luo, C., Zheng, J., & Yang, J. (2022). Direct determination of free nicotine content in tobacco. *ACS omega*, 7(27), 23061-23068. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00089>

8. Domingues, C. E., Kordiak, J., Pedroso, C. R., Stremel, T. R. de O., Zittel, R., Los Weinert, P., Vidal, C. M. de S., & De Campos, S. X. (2022). Determination of nicotine in cigarette tobacco smuggled to Brazil by modified QuEChERS methodology. *Orbital - The Electronic Journal of Chemistry*, 68–73. <https://doi.org/10.17807/orbital.v14i2.16188>
9. Tang, L., Yang, H., He, L., Wang, M., Zhu, B., & Liao, T. (2019). Direct analysis of free-base nicotine in tobacco leaf by headspace solid-phase micro-extraction combined with gas chromatography/Mass spectrometry. *Accreditation and Quality Assurance*, 24(5), 341-349. <https://doi.org/10.1007/s00769-019-01381-z>
10. Famele, M., Palmisani, J., Ferranti, C., Abenavoli, C., Palleschi, L., Mancinelli, R., Fidente, R. M., de Gennaro, G., & Draisci, R. (2017). Liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of nicotine and minor tobacco alkaloids in electronic cigarette refill liquids and second-hand generated aerosol: Famele et al. *Journal of Separation Science*, 40(5), 1049–1056. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601076>
11. *Pöschl tobacco group*. (2016, enero 7). Poeschl Tabak; Pöschl Tabak GmbH & Co. KG. <https://www.poeschl-tobacco.com/en/company/poeschl-tobacco-group-en/>
12. *Start - Stubbe-Flandria - Quality Tobacco's*. (2023, abril 14). Stubbe-Flandria - Quality Tobacco's. <https://www.stubbe-flandria.be/es/sobre-nosotros/artesania-e-innovacion/>
13. *How a cigarette is engineered* (2019, abril 24) U.S Food and Drug Administration; FDA. <https://www.fda.gov/tobacco-products/products-ingredients-components/how-cigarette-engineered>

7.2 Figuras

1. Estructura de la nicotina obtenida en la página Chemdraw Direct. Recuperado el 20 de abril de 2024, de <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html?wasm=1>
2. Researchgate.net Recuperado el 24 de abril del 2024 <https://www.researchgate.net/publication/235706953> Aspectos moleculares del envejecimiento
3. Psicoactiva.com. Recuperado el 24 de abril de 2024, de <https://www.p psicoactiva.com/blog/la-dopamina-efectos-fisicos-psicologicos/>
4. Merckmillipore.com. Recuperado el 24 de abril de 2024, de https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Quinoline,MDA_CHEM-802407?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F
5. Estructura del PSA obtenida en la página Chemdraw Direct. Recuperado el 17 de abril de 2024, de <https://chemdrawdirect.perkinelmer.cloud/js/sample/index.html?wasm=1>

8. Anexos

8.1 Cálculo de LOD y LOQ

Para obtener el LOD y LOQ se toman las áreas de los picos obtenidos de los cromatogramas de los blancos. Estos vienen representados en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Representación de los blancos y sus áreas de pico

Nº de blanco	Área de pico
1	516,1
2	116,2
3	238,7

Como se observa en la *Tabla 7* los valores de la integración del blanco son demasiado elevados, por lo que puede que se haya cometido un error al llevar a cabo este proceso.

Se obtienen los siguientes valores: $S_B = 167,3$ y $m = 534,9$.

Sustituyendo estos valores en las *Ecuaciones 1 y 2* da el siguiente resultado:

$$LOD = \frac{3S_B}{m} = \frac{3 \cdot 167,3}{534,9} = 0,9 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10S_B}{m} = \frac{10 \cdot 167,3}{534,9} = 3,1 \text{ ppm}$$