Određivanje koncentracije nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima

Kurbaša, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:497412

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Kurbaša

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2018./2019.

Mentor:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Kurbaša

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Diplomski rad

Akademska godina: 2018./2019.

Mentor:

prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019. god.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet

Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA

Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti

Znanstveno polje: Farmacija

Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija

Tema rada prihvaćena je na 60. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća

Kemijsko tehnološkog fakulteta i sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta

Mentor: prof. dr.sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NIKOTINA I NJEGOVIH METABOLITA U BIOLOŠKIM UZORCIMA

Ivana Kurbaša, broj indeksa 127

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za određivanje koncentracija nikotina i njegovih metabolita i biološkom uzorku urina pomoću izrade umjernih krivulja otopina referentnih standarda poznatih koncentracija te pomoću njih izračunati nepoznate koncentracije u uzorcima urina u kojima su koncentracije nikotna i metabolita nepoznate. Odrediti validacijske parametre navedene metode.

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC Split.

Materijali i metode: Otopine za izradu baždarne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda, prvo u metanolu te zatim u uzorku urina,nakon čega su uzeti jednaki volumeni istih koncentracija sve tri tvari te smo pokrili veće koncentracijsko područje. MIX otopine standarda su ekstrahirani metodom tekuće-tekuće (LLE), razrijeđeni kloroformom i analizirani plinskom kromatografijom s masenim spektrometrom snimanjem ukupne ionske struje (TIC). Nakon izrade baždarnih krivulja, slijedi njihova primjena u određivanju koncentracije nikotina i metabolita u realnim uzorcima urina.

Rezultati: Umjerne krivulje za nikotin, kotinin i 3-OH -kotinin uspješno su napravljene pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem otopina standarda u urinu pri koncentracijama od 0,3-1000 ng/mL. Dokazana je linearnost metode sa koeficjentom korelacije $R>0,99$. Ponovljivost također zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD<10\%$). Masene koncentracije detektiranih nikotina i njegovih metabolita u uzorcima nepoznatih koncentracija izračunate su pomoću prethodno izrađenih baždarnih krivulja.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja potvrdili su izbor GC-MS tehnike u kombinaciji sa prethodnom LLE ekstrakcijom željenih analita za kvantitativno određivanje nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima urina. Provedeni validacijski faktori zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Dokazana je prisutnost nikotina i metabolita i u nepušača čime se pokazuje veliki utjecaj pasivnog pušenja na ljude. Daljna istraživanja bi trebala uključivati veliki broj nepušača i razne uvjete izlaganja pasivnom pušenju.

Ključne riječi: nikotin, urin, GC-MS, validacija

Rad sadrži: 66 stranica, 27 slika, 9 tablica, 33 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Prof. dr. sc. Marija Definis-Gojanović	predsjednica Povjerenstva
2. Doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić	član
3. Prof. dr. sc. Davorka Sutlović	član-mentor

Datum obrane: 26.09.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici

Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine

Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy

University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences

Scientific field: Pharmacy

Course title: Pharmaceutical toxicology

Thesis subject was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, and Faculty Council of School of Medicine.

Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.

DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF NICOTINE AND ITS METABOLITES IN BIOLOGICAL SAMPLES

Ivana Kurbaša , index number:127

Summary:

Objectives: The objective of this study was to develop a method for simultaneous concentration determination of nicotine and its metabolisms in biological urine sample by making calibration curves using reference standard solutions of known concentrations to calculate unknown concentrations in urine samples. Determine the validation parameters of the specified method.

Settings: Laboratory of toxicology, Department of patholog and cytology, University Hospital of Split

Materials and methods: Calibration solutions were obtained by serial dilution of the reference standards, first in methanol and then in a urine sample. MIX solutions of the standards were extracted by liquid-liquid (LLE) method, diluted with chloroform and analyzed by total ion current (TIC) gas chromatography with mass spectrometer.

Results: Calibration curves for nicotine, cotinine, and 3-OH-cotinine were successfully constructed using the obtained signals by the targeted measurement of standard solutions in urine at concentrations of 0.3-1000ng / mL. The linearity of the method with a correlation coefficient R> 0.99 was proved. Repeatability also meets the eligibility criterion (RSD <10%).

Conclusion: The results of this study confirmed the choice of GC-MS technique in combination with previous LLE extraction of desired analytes for the quantitative determination of nicotine in biological urine samples. The validation factors performed satisfy the eligibility criterion. The presence of nicotine and metabolites in non-smokers has also been demonstrated, demonstrating the high impact of secondhand smoke on humans. Further studies should include a large number of nonsmokers and various conditions of exposure to secondhand smoke.

Key words: nicotine, urine, GC-MS, validation

Thesis contains: 66 pages, 27 figures, 9 tables, 33 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Marija Definis-Gojanović- PhD - full prof.	Chair person
2. Daniela Šupe-Domić – PhD – assistant prof.	Member
3. Davorka Sutlović - PhD- full prof.	Supervisor

Defence date: September 26th 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in

Library of School of Medicine, Šoltanska 2.

ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na stručnom vodstvu, strpljenju i pruženom znanju tijekom izrade ovog rada***.**

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima te baki Dobrili i djedi Tomi na velikoj podršci tijekom studiranja i vjeri u moj uspjeh.

Sadržaj:

1. UVOD 1
1.1. Opće karakteristike nikotina 2
1.1.2. Učinci nikotina i pušenja na zdravlje 3
1.2. Metabolizam nikotina 5
1.2.1. Biotransformacija i toksičnost 5
1.3. Određivanje nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima 7
1.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće(LLE) 9
1.5. Plinska kromatografija 11
1.6. Masena spektrometrija 12
1.7. GC-MS 13
1.8. Validacija metode 14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Priprema standardnih otopina nikotina, kotinina i trans-3′-hidroksikotinina 20
3.2. Priprema uzoroka za toksikološku analizu GC-MS-om 24
3.3. Kvantitativna analiza realnog biološkog uzorka urina 24
3.4. Korištene kemikalije 25
3.5. Instrumenti 25
3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom 25
4. REZULTATI 27
4.1. Analiza referentnih standarda nikotina ,kotinina i 3-OH-kotinina 28
4.2. Validacijski parametri provedene metode analize referentnih standarda 28
4.3. Kvantitativna analiza realnog biološkog uzorka mokraće nepušača i pušača 40
5. RASPRAVA 43
6. ZAKLJUČAK 46
7. POPIS LITERATURE 48
8. SAŽETAK 52
9. SUMMARY 55
10. ŽIVOTOPIS 58

1. UVOD

1.1. Opće karakteristike nikotina

Nikotin je alkaloid koji se dobije ekstrakcijom biljke Nicotiana tabacum, Nicotiana rustica i dr. (Slika 1). Nikotin je tercijarni amin, bezbojna uljasta tekućina, gorka okusa, topiv u vodi i lužnatog Ph. Jedan je od najjačih biljnih otrova, neurotoksin koji djeluje na središnji i periferni živčani sustav. Po broju oboljelih, nikotinska ovisnost nadmašuje sve druge oblike ovisnosti, pogađajući više od 50% svih odraslih u nekim zemljama (1). Nikotin iz duhanskog dima supstancija je koja izaziva ovisnost. Kada nikotin uđe u organizam, vrlo se brzo distribuira kroz krvotok. Prelazeći moždanu barijeru, već za oko 7 sekundi stiže u mozak te djeluje na mozak mijenjajući njegovu strukturu i funkcioniranje. Djeluje ponajprije na mezolimbički dopaminski sustav, rezultirajući osjećajem ugode, zadovoljstva i poboljšanog raspoloženja (2).



Slika 1. Nicotiana tabacum, cultivated tobacco (3).

Nikotin je selektivni agonist nikotinskih acetilkolinskih receptora (nAChR) koji se normalno aktiviraju acetilkolinom, te imaju važnu ulogu u mnogim kognitivnim procesima. Nagradni učinak nikotina također uključuje PVT, u kojem su nAChR izraženi na dopaminergičnim neuronima. Kad nikotin pobudi projekcijske neurone, dopamin se otpusti u akumbensu i u prefrontalnom korteksu, na taj način ispunjavajući dopaminergični uvjet za opojnu drogu (2).

Sindrom ustezanja nikotina blag je u usporedbi s opioidnim ustezanjem, a uključuje iritabilnost i probleme sa spavanjem. Međutim ubraja se u vrlo adiktivne tvari, a relaps nakon pokušaja prestanka vrlo je uobičajen (2). U duhanu koji se puši nikotina ima između 1-3%, a njegova smrtnonosna doza za odrasle osobe je oko 60 mg. Jedna cigareta prosječno sadrži 1 g duhana, odnosno 20-30 mg nikotina, od čega se oslobodi 0,5-2 mg nikotina (1).

1.1.2. Učinci nikotina i pušenja na zdravlje

Epidemija pušenja jedna je od najvećih javnozdrastvenih prijetnji s kojima je čovječanstvo ikada bilo suočeno. Svjetska zdrastvena organizacija (SZO) procjenjuje da duhan ubija gotovo polovicu osoba koje ga upotrebljavaju. Svake godine duhan (izravno i neizravno) ubije oko 6 milijuna ljudi. Među 4000 kemikalija koje su sastojci duhanskog dima za više od 70 je dokazano da imaju karcinogeno djelovanje (5). Ne treba zaboraviti ni podražajno, toksično, psihoaktivno i termičko djelovanje, dokazano u daljnih 250 supstancija. Samo neke od štetnih supstancija koje se nalaze u duhanskom dimu jesu: nikotin, katran, ugljični monoksid, cijanovodik, formaldehid, amonijak, kadmij, toluen, metanol, arsen i dr. (5). Pušenjem duhana razvija se psihička ovisnost, najčešće jakog i vrlo jakog inteziteta, nakon koje se može javiti i fizička ovisnost. Kod dugotrajnog uzimanja razvijaju se simptomi otrovanja kao što su lupanje srca, kronični katar dušnika i bronhija, a može doći i do popuštanja srca, kome i smrti. Kod apstinencije javlja se razdražljivost, agresivnost, depresija, smanjenje koncentracije itd. (1). Pušenje je povezano sa povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti kao što su koronarna srčana bolest, aterosklerotična vaskularna bolest i srčani udar. Nikotin i ugljikov monoksid (CO) akutno djeluju na srčanu aktivnost i uzrokuju tahikardiju, hipertenziju i vazokonstrikciju (4). Komponente duhanskog dima oštećuju endotel krvnih žila i povisuju razine slobodnih masnih kiselina i vazopresina u krvi. Kronično izlaganje duhanu uzrokuje povečanje serumskog kolesterola i smanjnje HDL. Nikotin može sudjelovati u akutnoj koronarnoj ishemiji tako što istovremeno povećava srčani rad i time povećava potrebu srca za nutrijentima, a smanjuje zalihu nutrijenata zbog koronarne vazokonstrikcije (4).

Plućne bolesti povezane sa pušenjem duhana su kronična opstruktivna bolest pluća (COPB), astma, pneumonija, gripa, bronhitis, emfezema te najčešći oblik karcinoma u populaciji muškaraca u Hrvatskoj, karcinom pluća (4). Duhanski dim sadrži više od 40 karcinogena kao što su: poliaromatski i heterociklički ugljikovodici, nitrozoamini, aromatski amini, aldehidi, radioaktivni elementi i dr. Drugi oblici raka koji su povezani s pušenjem su: karcinom usne šupljine i jezika, karcinom ezofageusa, karcinom larinksa, gušterače, mjehura i bubrega. Postoje podaci da upravo nikotin teoretski može imati ulogu promotora u razvoju raka, ali većina utjecaja duhana na razvoj karcinoma dolazi od ne nikotinskih sastojaka duhanskog dima (2).

Većina nikotina u cigaretama se razgradi izgaranjem ili se „izgubi“ u neudahnutom dimu. Nikotin unesen u organizam, putem usne sluznice dišnog sustava i kože, brzo se apsorbira (1). Nikotin se prenosi putem posteljice te se u manjoj koncentraciji nalazi i u mlijeku dojilja koje puše. Najopasniji štetni učinci nikotina: 1. stimulacijski učinak na SŽS koji može uzrokovati konvulzije i progredirati do kome i zastoja disanja, 2. depolarizacija živčano-mišićne spojnice s posljedičnim depolarizacijskim blokom i paralizom respiracijske muskulature i 3. hipertenzija i srčane aritmije (2). Liječenje akutnog otrovanja nikotinom je simptomatsko. Pretjerana muskarinska aktivnost može se kontrolirati atropinom, a stimulacijski učinak na SŽS parenteralnom primjenom diazepama (2). Neuromuskularna blokada međutim ne odgovara na farmakološko liječenje i može zahtijevati mehaničku respiraciju. Nasreću nikotin se brzo metabolizira i eliminira. Što se tiče kronične toksičnosti nikotina potencijal cigareta da uzrokuje ovisnost je izravno određen njihovim sadržajem nikotina (2). Nikotin pridonosi povećanom riziku od vaskularnih bolesti i nagle koronarne smrti koji su združeni s pušenjem. Osim toga doprinosi visokoj stopi relapsa ulkusa u pušača koji boluju od ulkusne bolesti (2) .

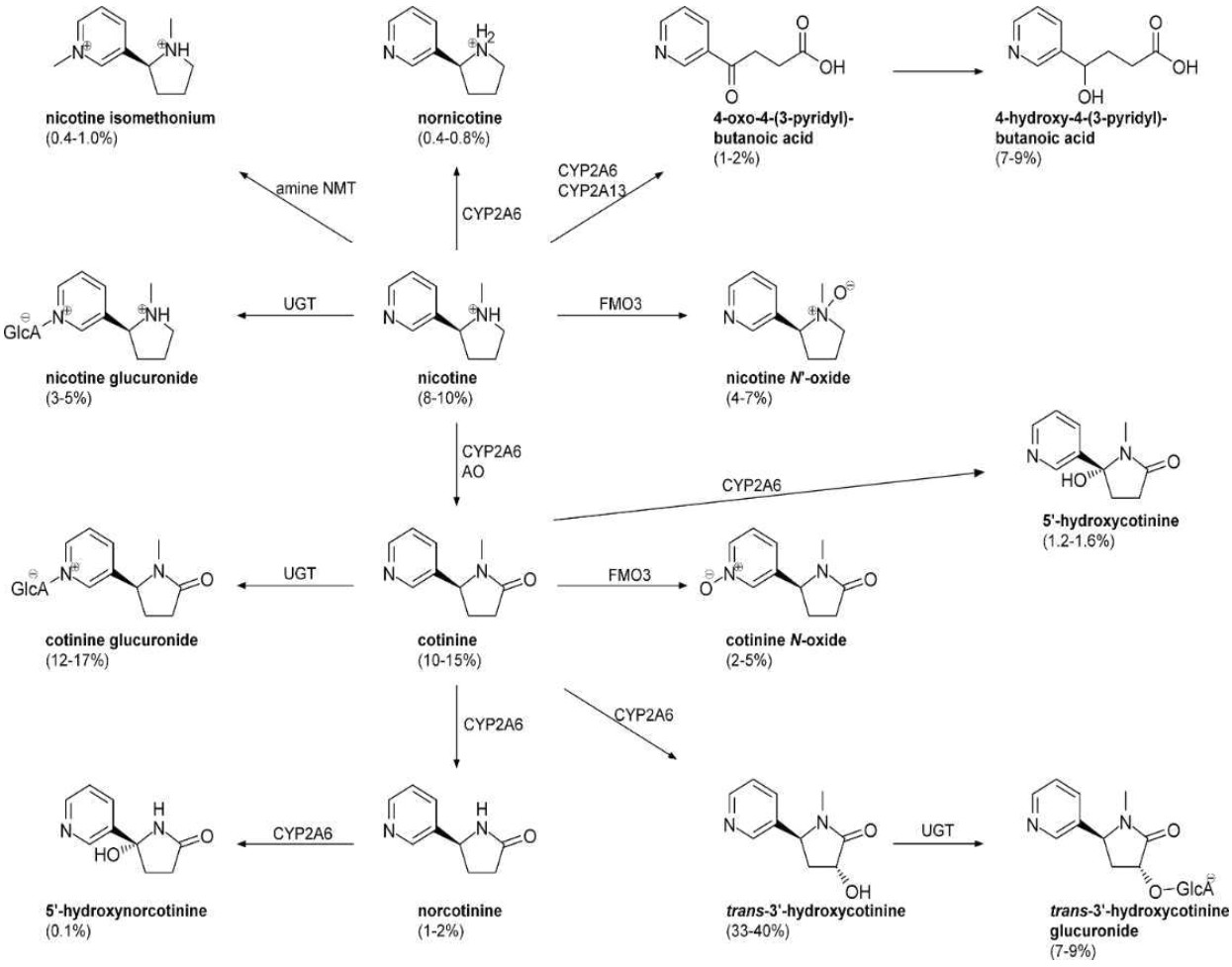
1.2. Metabolizam nikotina

Pušenjem se nikotin putem pluća brzo resorbira, a metabolizam se odvija u jetri gdje prelazi u farmakološki neaktivne metabolite kotinin i nikotin-1-N-oksid (1). Prvi produkt biotransformacije, pod djelovanjem CYP2A6, u čovjeka je 5′-hidroksinikotin koji se aldehid-oksidazom oksidira u kotinin. Kotinin je prvi većinski metabolit koji nastaje od nikotina u organizmu. Metaboliti se izlučuju bubrezima s vremenom poluodstranjivanja od 1 do 4 sata, a kod kroničnih pušača to vrijeme iznosi oko 2 sata. Ovisno o pH urina, 10-20% izluči se u nepromijenjenom obliku (1). Oksidaciju nikotina u kotinin kod malih koncentracija katalizira enzim CYP2A6, dok ostali enzimi oksidiraju nikotin kod velikih koncentracija. U oksidaciji nikotina u kotinin sudjeluje i aldehid-oksidaza koja katalizira oksidaciju intermedijarnog nikotin-1′ ,5′ -iminium iona (6). Oksidacija nikotina najprije se odvija na C5′ -atomu pirolidinskog prstena pri čemu nastaje C5′ -hidroksilirani metabolit. Kotinin, koji nastaje daljnom C5′oksidacijom pirolidinskog prstena, dalje se prevodi u C2′ -hidroksilirani metabolit te u manjoj mjeri u norkotinin i C4′ -hidroksilirani metabolit. Nastajanje norkotinina koji iz nikotina nastaje u manjoj mjeri, je također katalizirano CYP2A6 enzimom. N-oksidacija nikotina katalizirana je enzimom FMO3 i ta se reakcija odvija s visokim stupnjem stereoselektivnosti (6). Vrijeme poluodstranjivanja kotinina (COT) u usporedbi sa nikotinom kojemu je 0,5-3 h, je oko 19 h. Zato se njegovom koncentracijom u urinu lakše može dokazati konzumacija duhana (1). Glavni metabolit u urinu je Trans -3′-hidroksikotinin (THOC) koji je prvi prepoznat kao metabolit nikotina u urinu životinja i ljudi. Do 1987. nije bio prepoznat kao glavni metabolit nikotina zbog svoje polarnosti zbog koje ga je bilo teško ekstrahirati iz vode (10).

1.2.1. Biotransformacija i toksičnost

Putem metaboličkih reakcija u organizmu, iz nikotina mogu nastati tvari s mogućim karcinogenim učinkom (Slika 2.). Nikotin je svrstan u skupinu neurotoksičnih tvari, djeluje posebno na mozak u razvoju (centralni i periferni živčani sustav) generiranjem reaktivnih oblika kisika (ROS) slično pesticidu klorpirifosu (6). Karcinogeni N′ -nitrozonornikotin (NNN) prisutan je u duhanu i dimu cigareta, a nađen je u vrlo malim koncentracijama i urinu osoba koje koriste zamjenske nikotinske pripravke, za odvikavanje od pušenja (6). Smatra se da karcinogeni N′ -nitrozo derivat (NNN) može, u nekih osoba koje koriste zamjenske

pripravke nastati endogeno ili u kiselim uvjetima u želucu, u prisutnosti nitrata ili nitrita, ili iz nornikotina posredovanjem enzima bakterija (6). Superoksid anioni i hidroperoksidi su glavni izvor slobodnih radikala induciranih nikotinom i predstavljaju marker oksidativnog stresa. Kao takvi imaju ulogu u oštećenju sluznice oralne šupljine i razvoju raka usne šupljine i grla. Cilj jednog istraživanja iz 2018. godine (9) je bio odrediti koncentracije nikotina i kotinina u slini te status antioksidantnih enzima, level lipidnih peroksidaza i nitro oksida u slini kod konzumenta oralnih duhanskih proizvoda. Studijom je dokazana štetnos duhanskih prozvoda za žvakanje koji smanjuje količinu antioksidansnih enzima kao što su GST, glutation peroksidaza, katalaza i mokraćna kiselina a povečava količinu slobodnih radikala koji oštećuju stanice (9). Takodjer se smatra da primjena antioksidansa poput askorbinske kiseline može smanjiti rizik nastajanja mnogih slobodnih radikala i karcinogenog NNN, koji se u organizmu detoksicira konjugacijom s UGT2B10 (6).



Slika 2. Biotransformacija nikotina (7).

1.3. Određivanje nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima

Kotinin (COT) i Trans-3′-hidroksikotinin (THOC) su primarni metaboliti nikotina. Koncentracija COT-a i THOC-a u tjelesnim tekućinama može biti marker i aktivnog i pasivnog pušenja. Kao biomarkeri imaju prednost nad nikotinom jer imaju veće koncentracije u biološkim uzorcima te je njihovo poluvrijeme eliminacije znatno duže (8). Poluvrijeme eliminacije COT-a je oko 15-20 h, u usporedbi sa nikotinom kojemu je 0,5-3 h. Poluvrijeme eliminacije THOC-a je približno 5-6 h, ali kada THOC nastaje od COT-a, onda postaje približno kao i od COT-a (8). COT I THOC se mogu odrediti u serumu, urinu i slini, te je poluvrijeme eliminacije kotinina u sva tri uzorka isto (9). Nikotin i neki metaboliti mogu se naći i u kosima i noktima pogotovo kada je riječ o kroničnom izlaganju nikotinu, dok su kotinin i trans -3′ -hidroksikotinin u urinu pokazatelji nedavnog, akutnog unosa nikotina (10). Koncentracija COT-a je 3-8 puta viša u urinu nego u serumu. Odnos THOC-a i COT-a se naziva „nicotine metabolite ratio“ (NMR). Taj omjer je proporcionalan stupnju metabolizma nikotina kod pušača, odnosno što je veći NMR brži je metabolizam nikotina i ovisnost pojedinca o nikotinu je veća (11). Konverzija nikotina u kotinin kao i konverzija kotinina u trans -3′-hidroksikotinin je metabolizirana jetrenim enzimom CYP2A6, koji je odgovoran i za metaboličku aktivaciju koncerogenih duhan-specifičnih nitrozoamina. Zbog uočene povezanosti NMR-a i fenotipa pojedinca za CYP2A6 aktivnost, NMR se koristi kao biomarker aktivnosti tog enzima. NMR se može koristiti za procjenu rizika oboljenja povezanih sa konzumiranjem duhana i kao takav može biti koristan u razvoju individualne farmakoterapije za nikotinsku ovisnost (12). Dokazano je da pušači sa nižim NMR-om su uspješniji u odvikavanju od pušenja pomoću nikotinske zamjene ili placeba u usporedbi sa pojedincima s višim NMR-om. U jednoj studiji iz 2015.godine (13) se određivao NMR različitim metodama, a sve su metode uključivale metodu kromatografije udruženu sa masenim spektrometrom ili UV detektorom. Kod mjerenja NMR-a u plazmi ustanovljena je vrlo visoka korelacija, dok se kod uzoraka urina u usporedbi sa plazmom korelacija među metodama pokazala manjom ali također statistički značajnom i zadovoljavajućom. U usporedbi sa plazmom NMR urina je zato manje precizan marker CYP2A6 aktivnosti (13).

Za određivanje levela nikotina, kotinina i drugih metabolita u biološkim uzorcima najčešće se koriste kromatografske metode kao što su Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), Plinska kromatografija (GC), Kapilarna elektroforeza visoke

djelotvornosti (HPCE), Kolorimetrija i Imunoenzimski testovi. U većini studija koristi se HPLC u kombinaciji sa masenim spektrometrom (13). Pošto su piridinski derivati, u strukturi nikotina i kotinina nalazi se tercijarni i kvarterni amin, što rezultira njihovom velikom polarnošću. Kao alternativa većinski korištenoj normalnoj tekućinskoj kromatografiji u objavljenim studijama se za određivanje koncentarcije nikotina i kotinina koristi HILIC metoda (Tekućinska kromatografija sa hidrofilnom interakcijom) koja efikasno odvaja male polarne komponenete na polarnoj stacionarnoj fazi u kombinaciji sa masenim spektrometrom (13). HILIC kolumne pristaju kombinaciji LC-MS analizi vodotopivih polarnih komponenata zbog visokog organskog udjela u mobilnoj fazi što rezultira brzim isparavanjem otapala tijekom „electrospray" ionizacije. Matrix efekt uzorka uvijek je problem u HPLC-MS/MS analizi tijekom ionizacije, a predstavlja komponente u uzorku koje nisu analit, koje mogu davati lažne signale rezultirajući slabu linearnost i preciznost same metode. Najčešće se rješava pripremom kalibracijske krivulje pomoću standarda sa poznatom koncentracijom (13).

Prije kromatograske analize potrebno je izolirati spojeve iz biološkog uzorka. Endogene komponente u biološkom materijalu (proteini,lipidi...) mogu interferirati s analitom te ih je potrebno ukloniti prije analize, a analit koncetrirati (32). Za pripremu bioloških uzoraka najčešće se koristi ekstrakcija na čvrstim nosačima (Solid phase extraction, **SPE**) i ekstrakcija tekuće-tekuće (liquid-liquid extraction, **LLE**). Ekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPE) najčešće se odjeljuju organski spojevi iz biološkog materijala na temelju njihovih različitih afiniteta za nosače koji se nalaze u komercijalnim kolonama (31). Kod SPE analit se razdjeljuje između tekuće i čvrste faze koja ima jači afinitet za analit, nego otapalo u kojem je on otopljen . Čvrsta faza zadržava analit, a ostale komponente se ispiru i ne zadržavaju se na nosaču, nego samo prolaze (10). Osim spomenute dvije metode u raznim studijama koriste se i druge manje česte metode pripreme uzoraka, jedna od njih je **LPME** (Liquid phase microextraction) koja se razvila kao potreba za smanjivanjem potrošnje otapala. Postoji više vrsta LPME ekstrakcije, a u studiji iz 2017. godine (13) za određivanje nikotina i kotinina iz urina je korištena varijanta LPME ekstrakcije koja se naziva **DLLME** odnosno disperzivna tekuće-tekuće ekstrakcija u kojoj se u ekstrakcijski sustav dodaje disperzivni reagens koji tvar koja se ekstrahira brzo emulgira u otapalo. Nakon toga umjesto korištenja centrifuge razvijena je metoda SD (demulzifikacija otapala) koja omogućuje odvanje organske i vodene faze bez centrifugiranja čime je cili postupak DLLME završen u 10-ak minuta (13). Druga manje korištena metoda je **MEPS** (Micro eksttraction by packed sorbent) koja predstavlja jednostavnu metodu za izvođenje te koja je razvijena umanjivanjem konvencionalnih SPE

uređaja. Cilj MEPS-a je reducirati volumen sorbensa tako da bude prikladan za veliki raspon volumena uzoraka (tako niskih od 10-1000 mL) te smanjiti broj koraka koji su uključeni u standardnu SEP proceduru (14). Tipični MEPS je formiran u formatu igle u kojoj se nekoliko miligrama sorbenta nalazi unutar igle kao čep ili između cijevi i igle kao uložak. Materija sorbenta može biti silica gel, SCX ili MIPs (14). MEPS tehnika znatno poboljšava problem efekta matriksa tako što značajno smanjuje koncentraciju fosfolipida nakon prolaska kroz aparaturu. Konvencionalni SPE koriste velike volumene (2-15ml) organskih otapala, koji se onda otparavaju u svrhu obnavljanja analita (14). Nikotin je više isparljiv od kotinina iako oba mogu biti izgubljena tijekom isparavanja, zato odabir otapala i sam čin isparavanja su od kritične važnosti i treba ih izvoditi s oprezom da nebi došlo do gubitka analita. Kako bi se reducirala isparljivost nikotina, za pripravu nikotina u obliku soli koriste se agensi poput hidroklorne kiseline, octene kiseline, fosforne kiseline i dr. Kod MEPS metode proces uparavanja se preskače zbog vrlo malog volumena otapala prilagođenog odmah za GC-MS analizu (14).

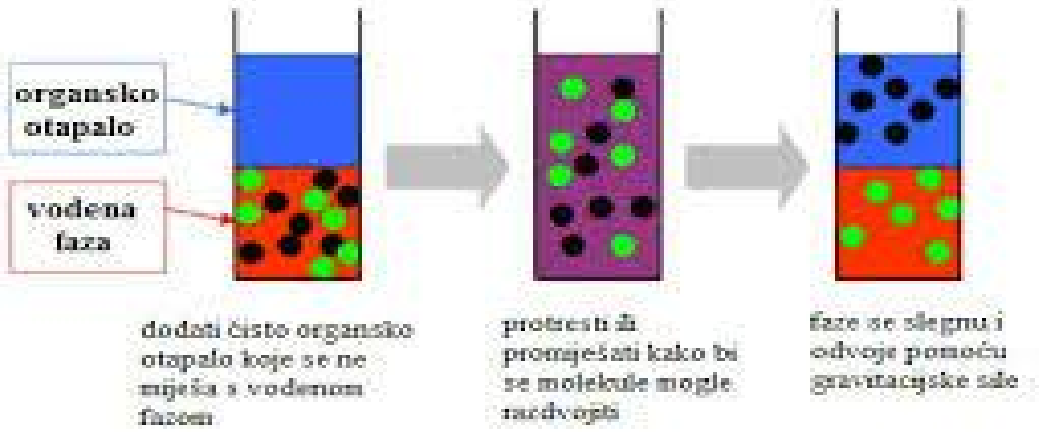
Veliki utjecaj na uspješnost ekstrakcije ima upravo Ph. U studiji iz 2009. godine (15) u kojoj su se određivale koncentracije nikotina i kotinina u urinu sa HPLC-om i GC-MS-om ispitivao se utjecaj pH na ekstrakciju analita. Uzorci urina su ekstrahirani pod različitim pH stanjima koristeći razne pufere. Najbolja ekstrakcija i za nikotin i kotinin se pokazala pri pH 13, jer njihove pK vrijednosti su 4.9 za nikotin i 9.7 za kotinin, znači nikotin je više bazičan nego kotinin. Pri visokom pH analiti su u bazičnom obliku (neionizirano stanje) te mogu biti lako ekstrahirani iz organskog otapala, a pri niskom pH analiti su u ioniziranom stanju i nemogu biti tako lako ekstrahirani iz organskog otapala (15).

U ovom radu smo koristili LLE (tekuće-tekuće ekstrakcija) metodu.

1.4. Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)

Ekstracija tekuće-tekuće (LLE) je postupak kojom se otopljena tvar raspodjeljuje između dviju tekućina koje se ne miješaju (Slika 3.). Najčešće je korištena metoda jer je relativno brza i jednostavna (31). Metoda se temelji na razlikama u pH i topljivosti analita u matrici (biološki uzorak je vodeni) i organskom otapalu pri određenom pH. Pravilan izbor otapala i reguliranja kiselosti uzorka osigurat će učinkovitu ekstrakciju ciljanog analita iz vodenog matriksa. Reguliranjem kiselosti uzorka neionizirane komponente iz vodene faze

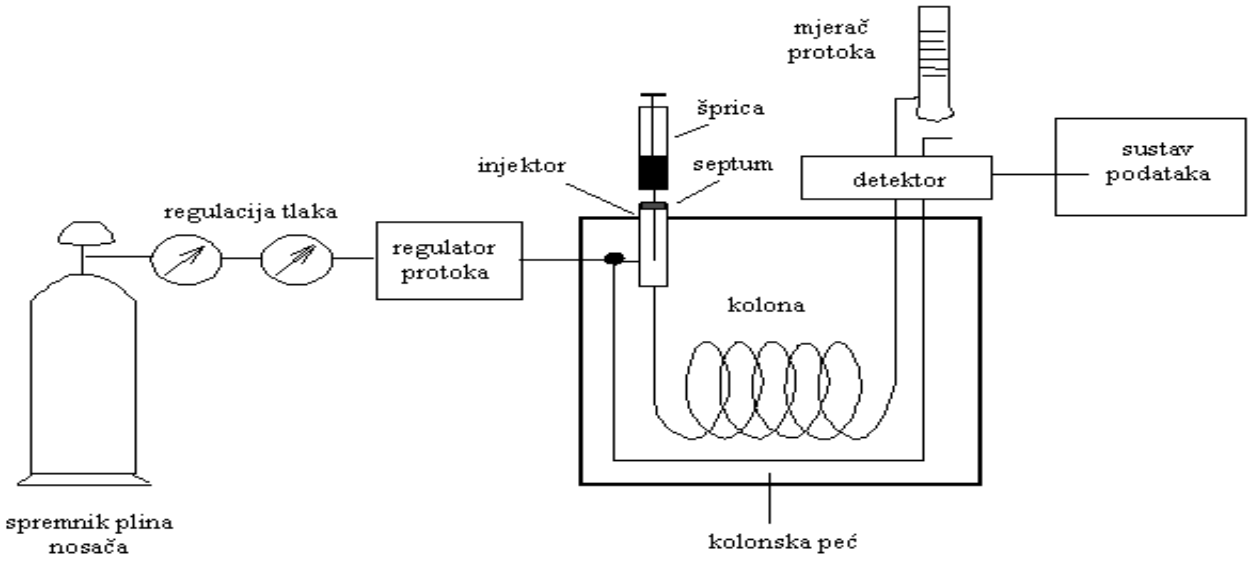
prelaze u organsko otapalo, dok ionizirani spojevi ostaju u vodenom mediju (31). Kiseli spojevi su relativno netopljivi u kiselom mediju i uglavnom se mogu ekstrahirati iz kiselih vodenih otopina u organsko otapalo. PH medija bi trebao biti 2 pH jedinice ispod pKa analita. Bazni spojevi su uglavnom netopljivi u alkalnim otopinama i mogu se ekstrahirati iz alkalnih vodenih otopina u organsko otapalo. Za njihovu ekstrakciju pH uzorka bi trebao biti 2 pH jedinice iznad pKa analita (17). Na topljivost analita utječu i temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije. Viša temperatura istodobno povećava topljivost i brzinu prijelaza analita te smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala što doprinosi većem stupnju ekstrakcije. Preduvjet za uspješnu ekstrakciju je pravilan izbor otapala, a za to je potrebno poznavati kemijska svojstva ispitivane tvari (31). Otapalo mora biti dovoljno polarno za odjeljivanje analita, a da se pritom izbjegne kontaminacija polarnim kontaminatima. Najčešće korištena otapala su heksan, toluen, dietileter, klorobutan, diklormetan, kloroform ili njihove smjese (17). Jednostavnija i brža LLE postiže se primjenom komercijalnih sustava. Ekstrakcija pomoću Toxi-Tubes (Varian) često je korištena metoda kojom se mogu ekstrahirati brojni analiti. Za ekstrakciju neutralnih i bazičnih spojeva koriste se Toxi-Tubes A (pH 9), a za ekstrakciju kiselih spojeva Toxi-Tubes B (pH 4,5) (31). Nedostatak ekstrakcije tekuće-tekuće je potreba za većim količinama organskih otapala i njihovo zbrinjavanje te neizbježni gubitci pri odvajanju slojeva pipetom zbog nastajanje emulzije uslijed čega se gubi granica dviju faza (17).



Slika 3. Prikaz odvajanja organske i vodene faze (16).

1.5. Plinska kromatografija

Uzorak kod plinske kromatografije mora biti preveden u plinovito stanje uzorka, ako već nije u plinovitom stanju. Pokretna faza je kemijski inertan plin: argon, helij, dušik ili ugljični dioksid. Nepokretna faza je nehlapljiva tekućina koja je nanesena na kruti nosač. Uzorak se brzo injektira kroz gumenu pregradu (tzv.septum) u kolonu (30). Mjesto za inektiranje uzorka, kolona i detektor su zagrijavani na malo više temperature koje omogućuju plinovito stanje uzorka. Primjenjuje se za analizu plinovitih tvari ili lako hlapljivih tvari koje isparavaju na radnoj temperaturi kolone (do 400°C), a da pritom ne dođe do njihove razgradnje. Volumeni injektiranih uzoraka u plinovitom stanju kreću se od 1 do 10 mL, dok se volumeni uzoraka u tekućem stanju kreću od 0,1 do 1 µl (20). Odjeljivanje se odvija raspodjelom komponenata u plinovitom stanju između pokretne faze koja je u plinovitom stanju, i nepokretne faze koja je u tekućem ili čvrstom stanju, a temelji se na različitim fizikalno-kemijskim svojstvima. Komponente uzorka koje se eluiraju s kolone, određuju se na detektoru (Slika 4.), na koji stižu u različitim vremenima. Mjerenjem vremena zadržavanja te usporedbom sa vremenima zadržavanja standarda čistih tvari, moguće je kvalitativno odrediti o kojem se spoju radi. Površina ispod kromatografske krivulje proporcionalna je koncentraciji razmatrane komponente, te je površina ispod kromatografske krivulje kvantitativan signal (19).

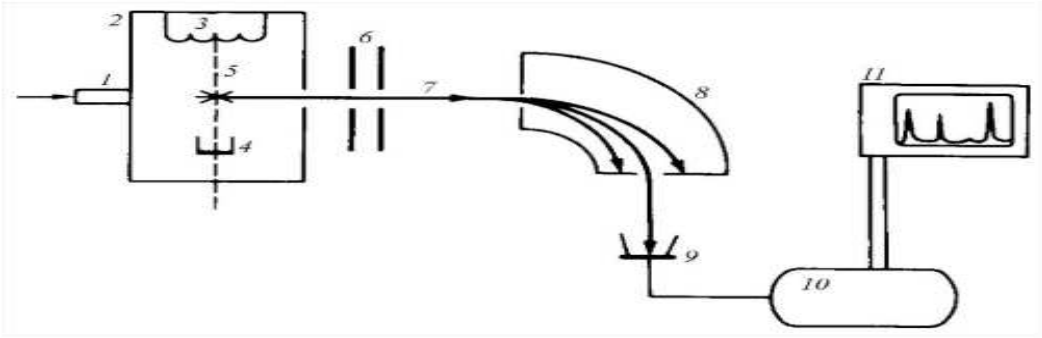


Slika 4. Model plinskog kromatografa (18).

1.6. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija (MS) analitička je tehnika koja ionizira kemijske spojeve i razvrstava ione na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). To je instrumentalna analitička tehnika kojom se određuje relativna masa i količina iona nastalih ionizacijom atoma i molekula te raspadom ioniziranih molekula nekog uzorka (30). Maseni spektrometar, koji radi u visokome vakuumu, sastoji se od 4 osnovna dijela: *sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora* koji stvara ione svojstvene ispitivanom uzorku (obično bombardiranjem atoma i molekula elektronima) i u električnom ih polju ubrzava, *analizatora* (najčešće magnetsko polje) koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja (*m*/*z*), te *detektora* u kojem se razdvojeni ioni skupljaju i karakteriziraju (21). Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se redom registrirati ioni različitih masa, čime nastaje maseni spektar karakterističan za određeni kemijski spoj. Osnovni tipovi analizatora su: Magnetni sektor, Kvadrupolni analizator, Ionska zamka, "Time of flight" i ion ciklotronska rezonancija (30). Detektor prepoznaje naboj iona, pojačava ga i šalje u bazu podataka gdje se pohranjuje u obliku masenog spektra tj. kao funkcija omjera m/z i inteziteta. Vrstom analizatora određena je i vrsta detektora (21).

i



MASENA SPEKTROMETRIJA, maseni spektrometar s magnetskim analizatorom - 1. sustav za unošenje uzorka; 2. ionski izvor; 3. katoda; 4. anoda; 5. elektronski snop; 6. električno polje; 7. ionski snop; 8. magnetsko polje; 9. detektor; 10. elektronička obradba signala; 11. zapis spektra

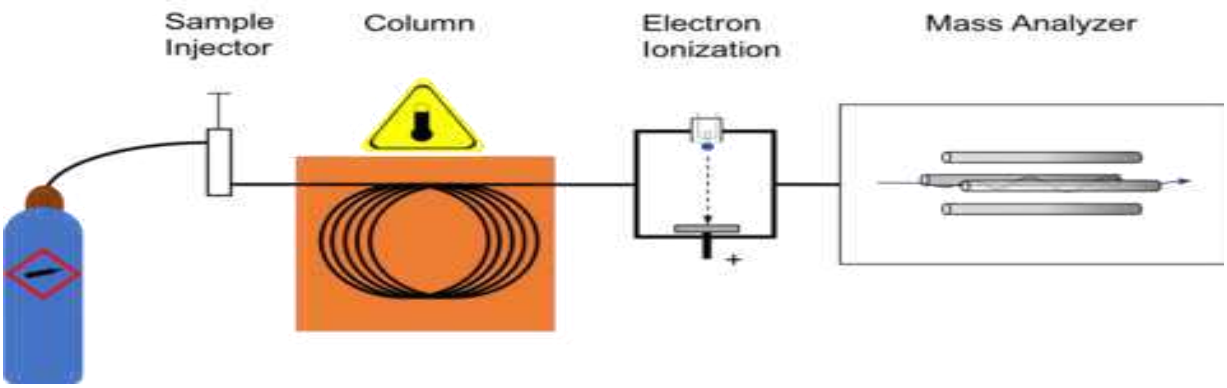
Slika 5. Masena spektrometrija (22).

Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese, prije analize prvo razdvajaju (19).

1.7. GC-MS

GC-MS je analitička metoda koja objedinjuje plinsko-tekućinsku kromatografiju (odjeljuje pojedine komponente uzorka i kvantificira ih) i spektrometriju masa (identificira svaku od komponenata pojedinačno). Kombinacijom ove dvije tehnike (Slika 6.) može se i kvantitativno i kvalitativno odrediti otopinu koja sadrži veliki broj hlapljivih komponenata (30).

Ova metoda je zlatni standard kod kvantitativne i kvalitativne forenzične i kliničke analize lijekova, sredstava ovisnosti i bioloških uzoraka. Glavna prednost GC-MS-a su bogate biblioteke EI (Electron Ionisation) spektara koje se godinama nadopunjuju i olakšavaju identifikaciju nepoznatog analita, što je osobito važno u području forenzične toksikologije (30). Povezivanjem ovih dviju metoda postignuto je međusobno nadopunjavanje uspješnog odjeljivanja komponenti smjese, koje pruža plinska kromatografija i podataka o masenom spektru pojedinih komponenti, ključnim za kvalitativnu analizu (24). Identifikacija se vrši uspoređivanjem vremena zadržavanja (engl. Retention time, RT) i masenog spektra analita s referentnim standardom. Prednosti GC-MS metode su visoka osjetljivost, preciznost, selektivnost i male količine uzorka potrebne za analizu (24). Nedostatak ove analize je dugotrajan i skup postupak pripreme te visoke radne temperature koje mogu dovesti do degradacije termolabilnih sastojaka uzorka (30).

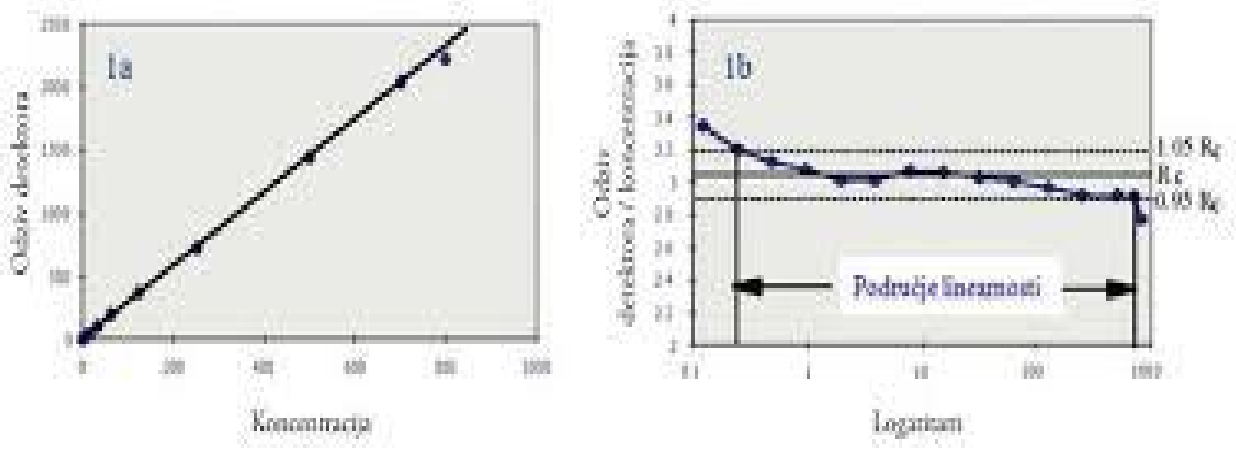


Slika 6. Skica plinskog kromatografa udruženog sa masenim spektrometrom (23).

1.8. Validacija metode

Validacija pokazuje da analitička metoda ispunjava kriterije koje se odnose na odgovarajuće značajke njene učinkovitosti, odnosno dokazuje da postupak te sustav u cjelini osiguravaju traženi (očekivani) rezultat. Validacija se sastoji od 7 parametara validacije, a to su: linearnost, granica detekcije i kvantifikacije , preciznost, točnost, specifičnost/selektivnost i područje primjene (25).

Linearnost podrazumijeva mogućnost metode da unutar danog područja daje rezultate mjerenja koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku unutar danog raspona. Linearnost se procjenjuje matematički i grafički. Preporučuje se vizualna procjena rezultata prikazanih u obliku grafa, i to kao ovisnost signala analita o koncentraciji, u kombinaciji s odgovarajućim statističkim izračunima (25). Matematički se izražava preko jednadžbe pravca ($y = ax + b$) i izračuna koeficijent korelacije r. Nagib pravca (a) je parametar koji ukazuje na osjetljivost metode, odsječak pravca (b) ukazuje na sustavnu pogrešku, a za koeficijent korelacije se uspostavlja kriterij $r \geq 0,99$. Kod niskih koncentracija se prihvaća $r \geq 0,98$. Ponekad je teško detektirati odstupanja od linearnosti, stoga su razvijene dvije dodatne grafičke metode. Prva metoda je konstruiranje grafa ovisnosti površine pika o koncentraciji ili o logaritmu koncentracije. Drugi pristup je sljedeći: signali, odnosno rezultati koji se dobiju mjerenjem podijele se odgovarajućim vrijednostima koncentracija, čime se dobije relativni odgovor metode (26). Grafički se prikaz konstruira tako da se na y-os nanesu izračunate relativne vrijednosti signala, a na x-os logaritamske vrijednosti odgovarajućih koncentracija. Dobivena krivulja (Slika 7.) bi trebala biti vodoravna kroz cijeli linearni raspon. Linearnost se gubi pri koncentracijama pri kojima krivulja koja predstavlja relativne vrijednosti siječe paralelne linije koje odgovaraju 95 postotnoj ili 105 postotnoj koncentraciji (26).



Slika 7. Prikaz ovisnosti odziva detektora o koncentraciji (1a) relativnih signala (omjer odziva detektora i odgovarajuće koncentracije) i logaritmu koncentracije (1b) (27).

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, tj. točka gdje je vrijednost mjernog rezultata veća od mjerne nesigurnosti s kojom se mjeri (28). **Granica kvantifikacije (LOQ)** je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost. Ona je također i koncentracija najnižeg kalibracijskog standarda (28). Ako se zahtijeva da metoda ima zadanu preciznost na granici kvantifikacije, pripremi se više uzoraka poznate koncentracije u području oko moguće granice kvantifikacije, svaki se izmjeri 5–6 puta i izračuna se relativno standardno odstupanje (eng. relative standard deviation, RSD) za svaku koncentraciju. Zatim se grafički prikaže odnos RSD-a prema koncentraciji i iz grafa odredi koncentracija na granici kvantifikacije s točno određenom preciznošću (28).

Preciznost predstavlja slaganje između niza ponovljenih mjerenja iz istog uzorka pri propisanim uvjetima eksperimenta. Također preciznost predstavlja raspršenost pojedinačnih uzoraka oko aritmetičke sredine. Izražava se kao standardna devijacija, relativna standardna devijacija ili standardna pogreška aritmetičke sredine (29). Provodi se pet do šest mjerenja s jednom do tri različite koncentracije, te ovisno o uvjetima razlikujemo:

1) preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko razdoblje između mjerenja (28).

2) međupreciznost je preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz očekivane promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti) (28).

3) preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost gdje promjenjivi uvjeti ukjučuju različite labaratorije, određuje se u svrhu normiranja metode i sastavni je dio validacije koju provodi sam laboratorij. Obnovljivost se određuje međulaboratorijskim usporedbama (28).

Točnost pokazuje slaganje srednje vrijednosti dobivenih rezultata i stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti. Kako bismo to dokazali napravimo analizu uzorka poznate koncentracije i usporede se izmjerene i stvarne vrijednosti. Točnost je također mjera pouzdanosti analitičke metode (29). Numerički pokazatelj točnosti eksperimentalno je utvrđeno sustavno odstupanje metode, dobiveno kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti ili kao njihov odnos. Uvjet **ponovljivosti** uključuje jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, te kratko razdoblje između provođenja metode, uzorci moraju biti svježe pripremljeni kao i standardi, reagensi i mobilna faza (29).

Specifičnost i selektivnost su svojstva metode da odredi željeni analit u prisutnosti određenih komponenata u matrici uzorka pod utvrđenim uvjetima. Za metodu kažemo da je specifična kada se može odrediti samo jedan specifičan analit u prisustvu ostalih komponenti u matriksu uzorka. Metoda za koju kažemo da je selektivna je metoda kojom se određuje više komponenti istodobno, ali pod uvjetom da te komponente ne smetaju jedna drugoj (29).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada su:

1. Razviti metodu određivanja koncentracija nikotina, kotinina i trans-3′ -hidroksikotinina u biološkim uzorcima urina plinskom kromatografijom s masenim detektorom (GC-MS).

2. Izraditi baždarne krivulje za nikotin i njegove metabolite kotinin i trans-3′ -hidroksikotinin pomoću referentnih standarda poznatih koncentracija.

3. Odrediti validacijske parametre napravljene metode.

4. Primjenom baždarne krivulje odrediti koncentraciju nikotina i metabolita u realnom biološkom uzorku urina pušača i nepušača.

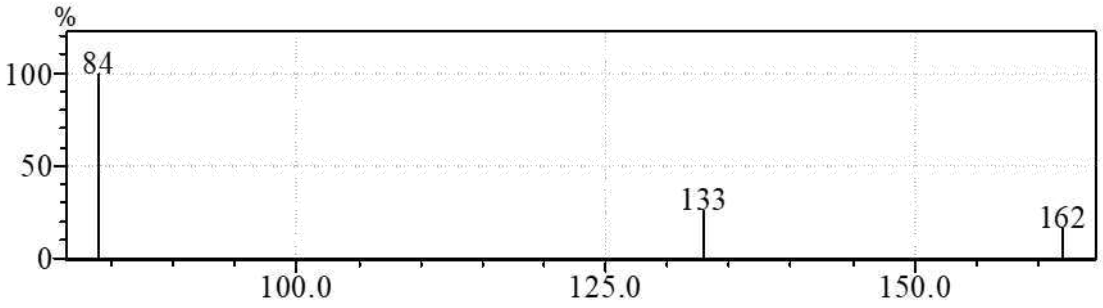
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema standardnih otopina nikotina, kotinina i trans-3′-hidroksikotinina

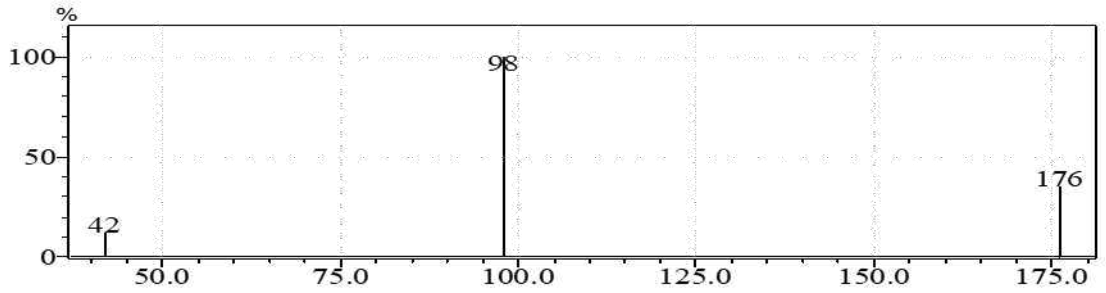
U ovom radu zbog metabolizma nikotina i izlučivanja njegovih metabolita te jednostavnosti rukovanja odabran je biološki uzorak urina. Urin je uzorak izbora za toksikološko probiranje jer sadrži više od 99% vode i mali udio endogenih tvari koji mogu interferirati s analitom (1). Za razvoj metode odnosno za izradu baždarne krivulje uzet je pripremljeni uzorak urina , kako bi baždarna krivulja bila pripremljena u mediju uzorka u kojemu će se određivati nepoznata koncentracija traženih analita.

Kvalitativna analiza:

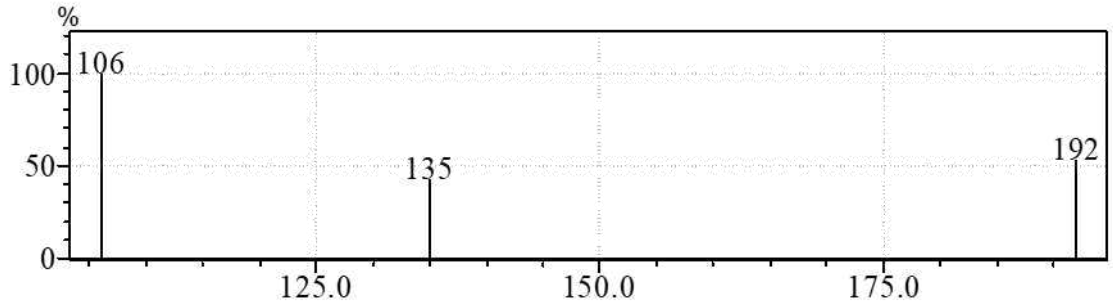
Na slikama 8. , 9. i 10. su prikazani spektri masa za analizirane referentne standarde dobivene vezanom tehnikom plinske kromatografije-spektrometrije masa. Spektri masa predstavljaju grafički prikaz iona (ionizirane molekule i ionizirani fragmenti nastali cijepanjem molekula u ionizatoru) i njihovih relativnih intenziteta. Ioni se prikazuju kao omjer njihove mase i naboja (m/z) brojevi u slici. Za pozitivnu potvrdu prisutnosti neke tvari trebaju odgovarati najmanje tri mase počevši od one najjačeg intenziteta. Os x prikazuje vrijednost odnosa mase i naboja (m/z) dok os y prikazuje njihov intenzitet. Dobiveni spektri masa uspoređeni su sa spektrima pohranjenim u bazama podataka.



Slika 8. Spektar masa za nikotin (m/z 84, 133, 162).



Slika 9. Spektar masa za kotinin (m/z 42, 98, 176).



Slika 10. Spektar masa za 3-OH-Kotinin (m/z 106, 135, 192).

Kvantitativna analiza:

Osnova kvantitativnog određivanja u kromatografiji je mjerenje površine pika ili visine pika. Kad su pikovi dobro razdvojeni, i površina i visina pika su razmjerni koncentraciji. Postoje tri kalabracijske metode: metoda eksternog, internog i dodanog standarda (33). U ovom radu korištena je metoda eksternog standarda koja je najjednostavnija. Njena pouzdanost ovisi o ponovljivosti injektiranja volumena uzorka i stabilnosti analitičkog postupka. Potrebno je pripremiti seriju standarda poznatih koncentracija. Odabiru se koncentracije koje su u koncentracijskom području analita. Povezivanjem površine pika (ili visine) s odgovarajućom koncentracijom dobije se pravac koji mora prolaziti kroz nulu. Otopine nikotina, kotinina i trans-3′-hidroksikotinina za izradu baždarne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda čije su koncentracije 1mg/mL. Osnovne standardne otopine su razrijeđene u metanolu kako bi se dobile standardne otopine nižih koncentracija (tablica 1.).

Tablica 1. Serijsko razrijeđivanje referentnih standarda u metanolu.

		Co	**C1=0,1mg/mL**	**C2=0,01 mg/mL**	**C3=0,001 mg/mL**	**C4=0,0001 mg/mL**	**C5=0,00001 mg/mL**
		Co	**100 000 ng/mL**	**10 000 ng/mL**	**1 000 ng/mL**	**100 ng/mL**	**10 ng/mL**
TVAR 1	NIKOTIN	1 mg/mL	50µLCo + 450µL metanola	50µLC1 + 450µL metanola	50µLC2 + 450µL metanola	50µLC3 + 450µL metanola	50µLC4 + 450µL metanola
TVAR 2	KOTININ	1 mg/mL	50µLCo + 450µL metanola	50µLC1 + 450µL metanola	50µLC2 + 450µL metanola	50µLC3 + 450µL metanola	50µLC4 + 450µL metanola
TVAR 3	3-OH-K	1 mg/mL	50µLCo + 450µL metanola	50µLC1 + 450µL metanola	50µLC2 + 450µL metanola	50µLC3 + 450µL metanola	50µLC4 + 450µL metanola

Nakon što su dobivene standardne otopine nižih koncentracija (C1=100 000 ng/mL, C2=10 000 ng/mL, C3=1000 ng/mL , C4=100 ng/mL i C5= 10 ng/mL), pripremljene otopine standarda dodane su u biološki uzorak urina te su dobivene navedene koncentracije (Tablica 2.)

Tablica 2. Dobivene koncentracije nikotina (Tvar 1), kotinina (Tvar 2) i 3-OH-kotinina (Tvar 3).

	Tvar 1 Vol_mL	Tvar 2 Vol_mL	Tvar 3 Vol_mL	Vol_urin (mL)	Ukupni volumen	Tvar 1 konc_konačna ng/mL	Tvar 2 konc_konačna ng/mL	Tvar 3 konc_konačna ng/mL
1	0,045 C1	0,045 C1	0,045 C1	4,365	4,5	1000	1000	1000
2	0,045 C2	0,045 C2	0,045 C2	4,365	4,5	100	100	100
3	0,045 C3	0,045 C3	0,045 C3	4,365	4,5	10	10	10
4	0,045 C4	0,045 C4	0,045 C4	4,365	4,5	1	1	1
5	0,045 C5	0,045 C5	0,045 C5	4,365	4,5	0,1	0,1	0,1

Nakon toga izrađene su MIX otopine (MIX 1, MIX 2, MIX 3, MIX 4, MIX 5) s ciljem da se pokrije veće koncentracijsko područje, koje su sadržavale jednak volumen od sve tri prethodno pripremljene otopine sa poznatom koncentracijom na slijedeći način: Uzeto je po 10µL (0,01 mL) od sve tri tvari ali iste koncentracije što znači da je ukupan volumen 30 µL, a nove koncentracije su izračunate po formuli C1*V1=C2*V2 (razrjeđivanje otopina). Podaci su prikazani u tablicama ispod (Tablica 3 i 4). Ovako pripremljene otopine korišene su za izradu baždarnih krivulja.

Tablica 3. Koncentracije pojedinih tvari u mix otopinama izražene u mg/mL.

MIX	C1 od N, K I 3-OH-K /(mg/mL)	V1 od N, K i 3-0H-K (mL)	C2 NIKOTIN mg/ml	C2 KOTININ mg/ml	C2 3-OH-K mg/ml
1	0,1	0,01	0,033	0,033	0,033
2	0,01	0,01	0,0033	0,0033	0,0033
3	0,001	0,01	0,00033	0,00033	0,00033
4	0,0001	0,01	0,000033	0,000033	0,000033
5	0,00001	0,01	0,0000033	0,0000033	0,0000033

Tablica 4. Koncentracije pojedinih tvari u mix otopinama izražene u ng/mL.

MIX	C1 od N, K I 3-OH-K /(ng/mL)	V1 od N, K i 3-0H-K (mL)	C2 NIKOTIN ng/ml	C2 KOTININ ng/ml	C2 3-OH-K ng/ml
1	100 000	0,01	33 000	33 000	33 000
2	10 000	0,01	3 300	3 300	3 300
3	1 000	0,01	330	330	330
4	100	0,01	33	33	33
5	10	0,01	3,3	3,3	3,3

3.2. Priprema uzoroka za toksikološku analizu GC-MS-om

Uzorci mokraće pripremljeni su za kromatografsku analizu ekstrakcijom tekuće-tekuće TOXI A SUSTAVOM. U staklene tubice sa novojem za LLE ekstrakciju odvagano je 1,8 g natrijevog volframata dihidrata, te je dodano 3 ml smjese diklormetana i etilacetata u omjeru 3:1. Zatim su dodana 2 ml uzorka urina koji je prethodno vorteksiran zbog nastanka taloga, te potom ekstrahiran na rotoru za ekstrakciju 10 min brzinom od 50 rpm.

Nakon zaustavljanja rotora, tubice su premještene u centrifugu i centrifugirane 15 minuta brzinom od 2600 rpm. U petrijeve zdjelice su izdvojena po 2,5 mL organske faze iz svake staklene tubice te su zatim uzorci evaporirani do suha u struji dušika. Nakon evaporiranja slijedi otapanje uzorka dodatkom 30μL kloroforma i pažljivo kvantitativno ispiranje stijenke petrijeve zdjelice i na kraju prebacivanje uzorka u staklne insert tubice za GC-MS analizu.

3.3. Kvantitativna analiza realnog biološkog uzorka urina

Nakon GC-MS analize referentnih standarda nikotina, kotinina i 3-hidroksikotinina i izrade baždarnih krivulja, analizirani su biološki uzorci urina pripremljeni i obrađeni na isti način kao i standardi (ekstrakcija toxi A-sustavom). Analizirana su dva uzorka, od kojih prvi uzorak pripada nepušaču, a drugi uzorak pripada kroničnom teškom pušaču (više od 20 cigareta na dan). Detektirani signali nikotina, kotinina i 3-hidroksikotinina zabilježeni su na svojim karakterističnim retencijskim vremenima. Masene koncentracije nikotina, kotinina i 3-hidroksikotinina su izračunate pomoću prethodno izračunatih baždarnih krivulja.

3.4. Korištene kemikalije

Korištene su slijedeće kemikalije:

Kloroform, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Natrijev volframat dihidrat, Merck, Darmstadt, Njemačka

Etil acetat, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

Diklormetan, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačkađ

Metanol, p.a., Merck, Darmstadt, Njemačka

3.5. Instrumenti

Korišteni instrumenti u ovom istraživanju su:

Za pripremu uzoraka za analizu: - Centrifuga Centric; Tehnica

- Digitalna tehnička vaga; Kern; mjerenje na 3 decimale
- Rotor za ekstrakciju, Vorteks; IKA
-Vortexer Cleaver Scientific Ltd
-Staklene petrijeve zdjelice(10cm) Duran group

Za kvantitativnu analizu: Plinski kromatograf s masenim spektrometrom;
Shimadzu GCMS-QP2010

3.6. Instrumentalna analiza GC-MS metodom

Za kromatografsku analizu pripremljenih uzoraka uzoraka i referentnih standarda za izradu baždarnih krivulja, korišten je plinski kromatograf sa spektrometrom masa Shimadzu GCMS-QP2010 (Slika 11.) koji je povezan sa računalnim programom GC-MS solution za obradu podataka i interpretaciju rezultata. Korištena je kapilarna kolona plinskog kromatografa Restek, RTx-5MS, dužine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine filma nepokretne faze 0,25 μm. Ovim GC-MS-om je moguće snimanje ukupnog ionskog kromatograma (engl. „Total ion chromatogram“, TIC) u masenom području 50-600 m/z, kao i snimanje samo odabranih iona (engl. Single ion monitoring, SIM). Radom u SIM-u, praćenjem samo

odabranih iona u određenom vremenskom intervalu, pojačava se osjetljivost spektrometra masa, ali smanjuje selektivnost.



Slika 11. Uređaj GC-MS s povezanim računalom.

Radni uvjeti: -volumen injektiranja: 1 µL (splitless)

- temperatura injektora: 250 °C
- protok plina nosioca: 1,3 mL/min (Helij)

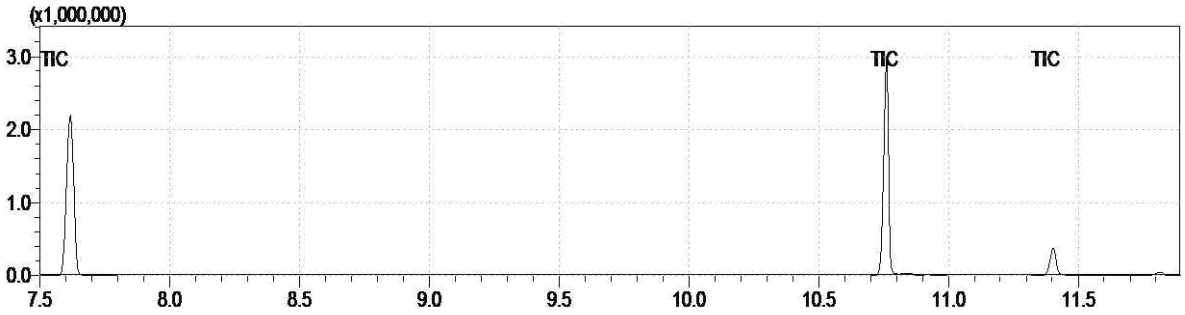
Ukupno trajanje programa:

1. 90ºC izotermno 3 min
2. 30ºC / min do 210ºC
3. 10ºC / min do 250ºC

4. REZULTATI

4.1. Analiza referentnih standarda nikotina ,kotinina i 3-OH-kotinina

Na slici (Slika12.) ispod prikazan je ukupni ionski kromatogram dobiven GC-MS analizom MIX-a koji sadrži referentne standarde nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin. U grafičkom prikazu kromatograma na osi x prikazano je vrijeme zadržavanja standarda u koloni (retencijsko vrijeme, RT) u minutama, a na osi y odaziv detektora, odnosno intenzitet signala**.**



Slika 12. Ukupni ionski kromatogram MIX otopine.

Prvi pik sa retencijskim vremenom od 7,6 je signal nikotina, drugi pik sa retencijskim vremenom od 10,7 je signal kotinina i treći pik sa retencijskim vremenom od 11,4 je signal od 3-hidroksikotinina.

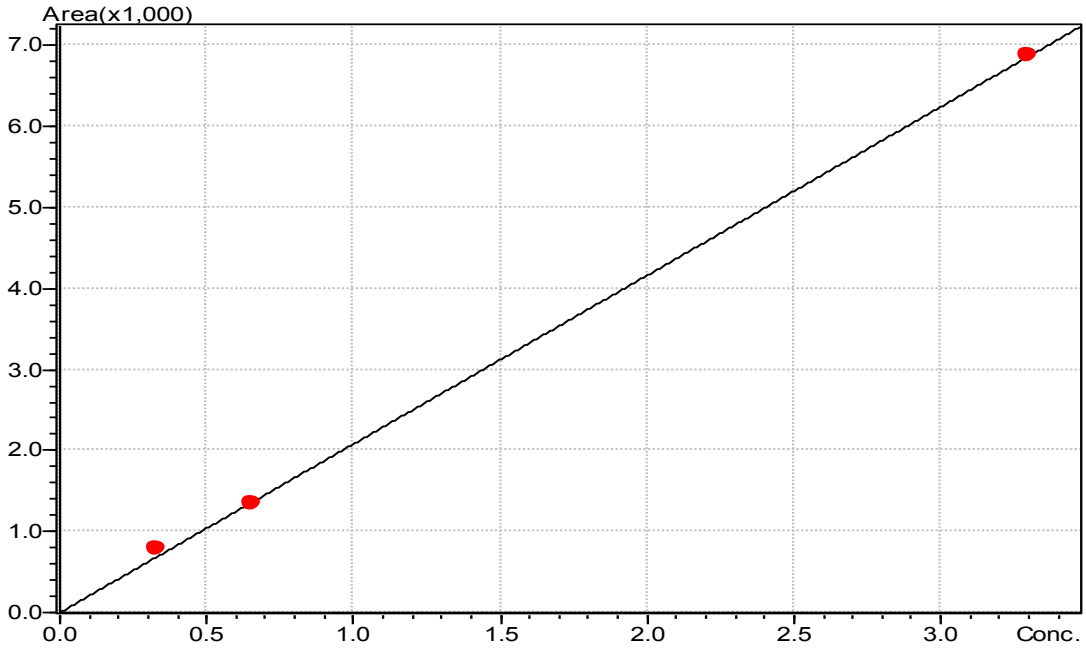
4.2. Validacijski parametri provedene metode analize referentnih standarda

Korištenjem zadanih radnih uvjeta i navedenih koncentracija pripremljenih umjernih otopina, određene su umjerne krivulje za navedene tri tvari u različitim koncentracijskim intervalima, prikazane na slijedećim slikama. Korištenjem izrađenih umjernih krivulja moguće je odrediti različite koncentracije nikotina, kotinina i 3-hidroksikotinina u biološkim uzorcima.Određeni su slijedeći parametri validacije:

1) Linearnost

Linearnost je mogućnost metode da unutar određenog područja daje rezultate proporcionalne koncentraciji analita u uzorku. Određuje se izradom kalibracijskog pravca.

Na slikama ispod prikazane su baždarne krivulje u različitim koncentracijskim područjima i pripadajući kromatogrami prema slijedećem redu: Nikotin, Kotinin te 3-hidroksikotinin



Slika 13. Baždarna krivulja nikotina u koncentracijskom području od 0,3-0,33 ng/mL.

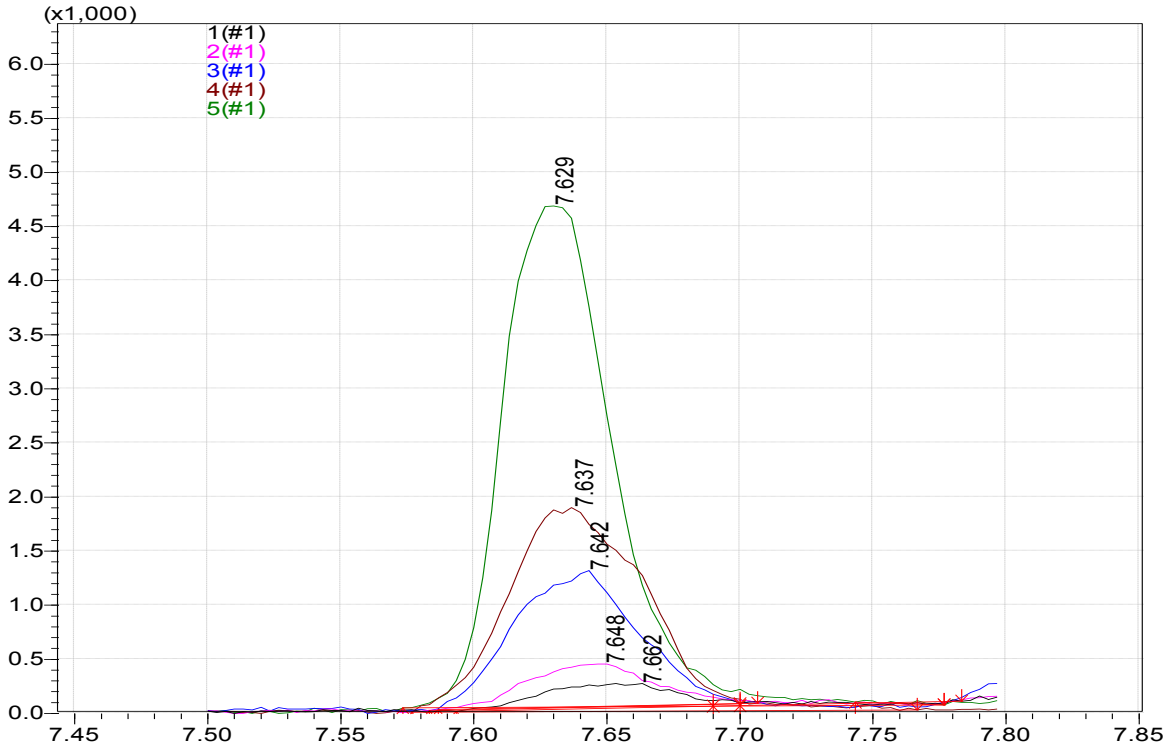
Statistički podaci:

Mean RF : 2156.061
RF SD : 190.7105
RF %RSD : 8.845324

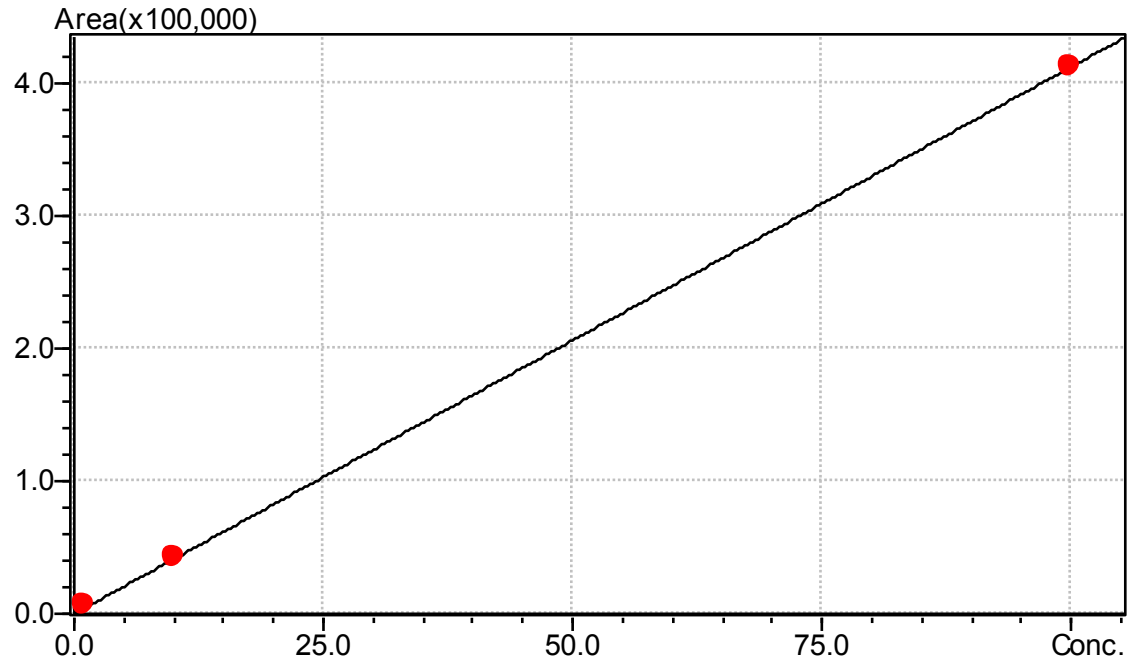
Jednadžba kalibracijskog: Y = 2081,991X+ 0.0 , b (nagib pravca)= 2081,991

R^2 = 0.9995845, R = 0.9997923

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 14. Usporedba različitih koncentracija nikotina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.



Slika 15. Baždarna krivulja za nikotin u koncentracijskom području od 0-100 ng/mL.

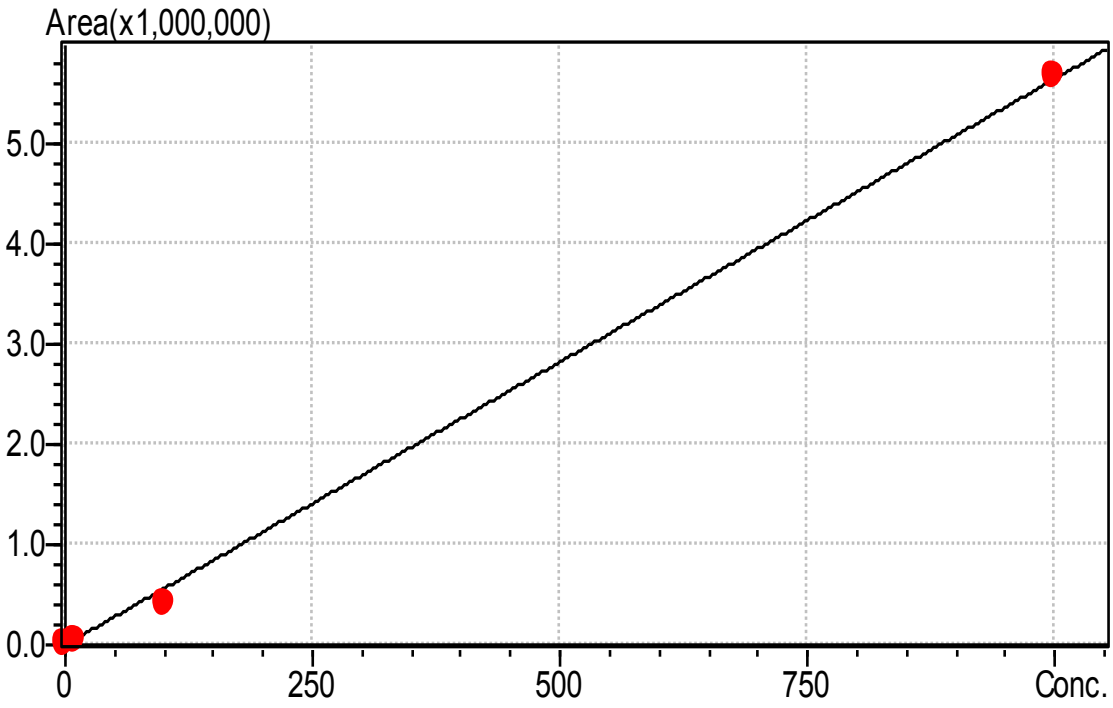
Statistički podaci:

Mean RF : 4940.288
RF SD : 1,266.203
RF %RSD : 25.63014

Jednadžba kalibracijskog pravca : Y = 4126.892 X + 0.0 , b (nagib pravca)= 4126.892

R^2 = 0.9999993, R = 0.9999997

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 16. Baždarna krivulja za nikotin u koncentracijskom području 0-1000 ng/mL.

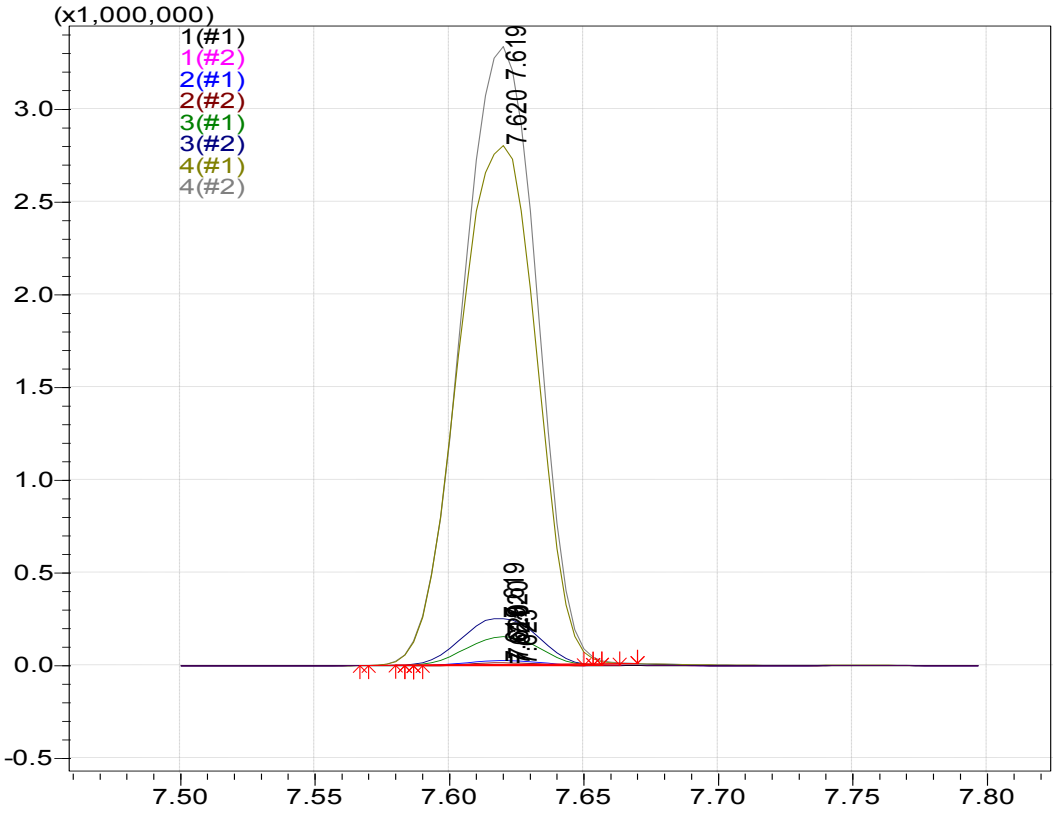
Statistički podaci:

Mean RF : 1101.569
RF SD : 590.8458
RF %RSD : 53.63675

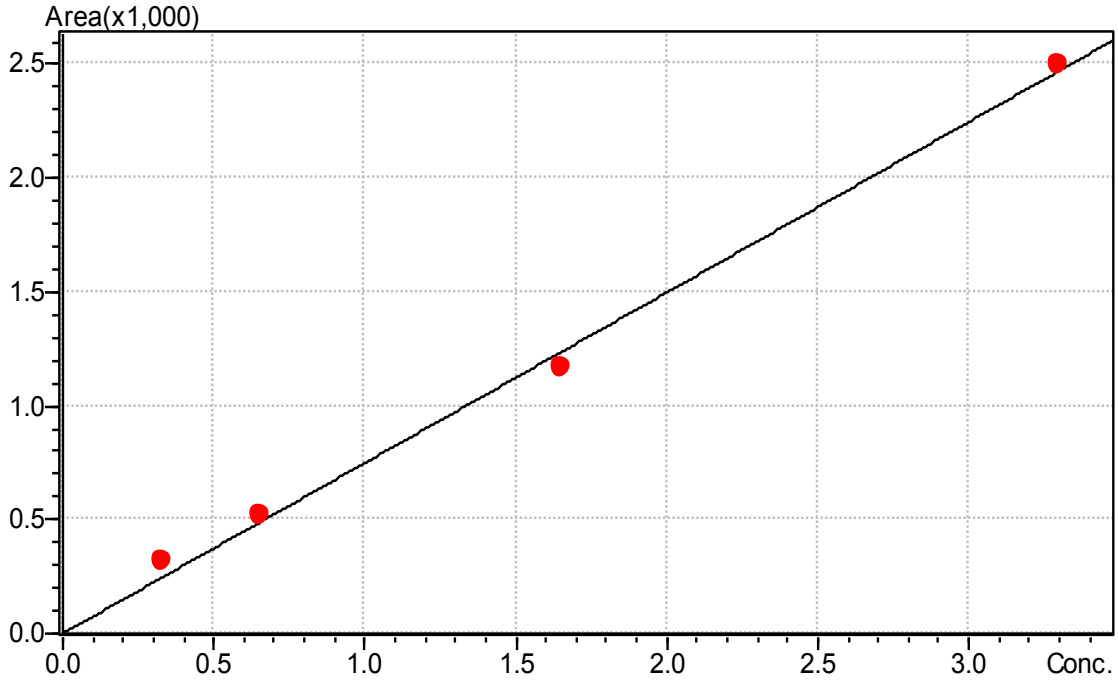
Jednadžba kalibracijskog pravca: Y = 860.7555X + 0.0, b (nagib pravca)= 860.7555

R^2 = 0.9993568, R = 0.9996784

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 17. Usporedba različitih koncentracija nikotina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.



Slika 18. Baždarna krivulja kotinina u koncentracijskom području od 0,3-0,33 ng/mL.

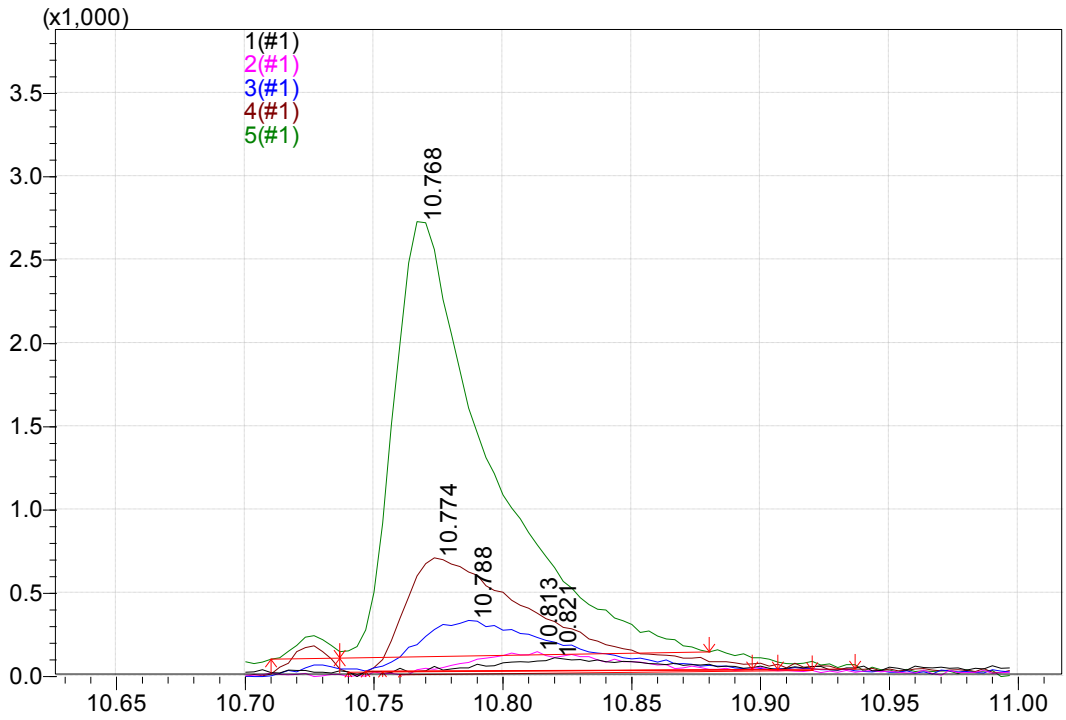
Statistički podaci:

Mean RF : 799.4697
RF SD : 109.2104
RF %RSD : 13.66036

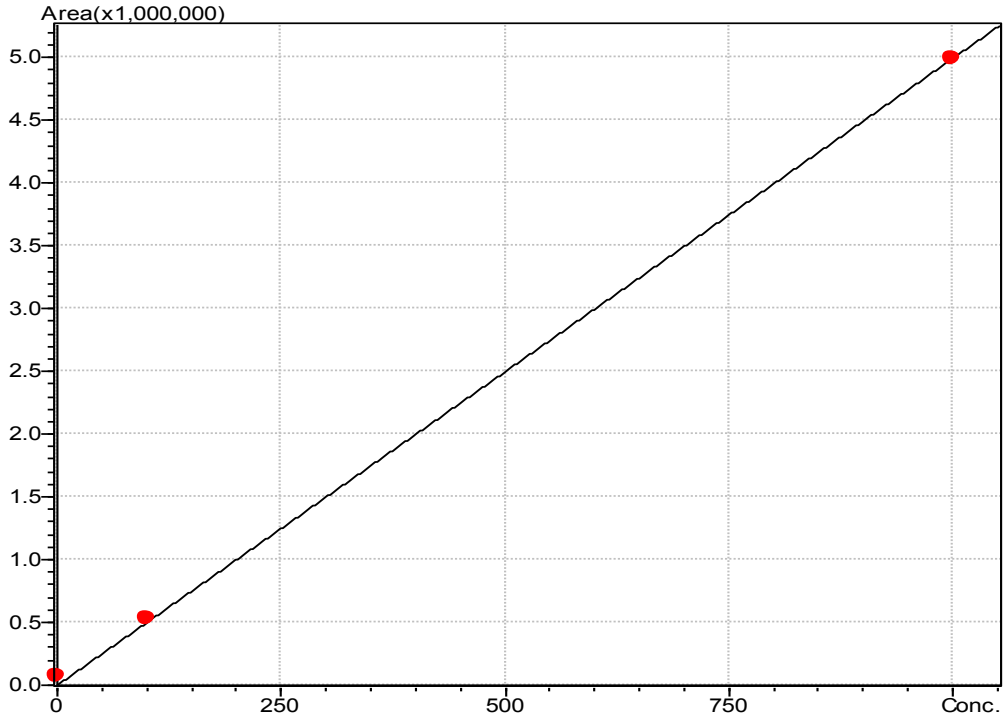
Jednadžba kalibracijskog pravca: Y = 749.4173 X + 0.0 , b (nagib pravca)= 749,4173

R^2 = 0.9968603, R = 0.9984289

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 19. Usporedba različitih koncentracija kotinina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.



Slika 20. Baždarna krivulja za kotinin u koncentracijskom području od 0-1000 ng/mL

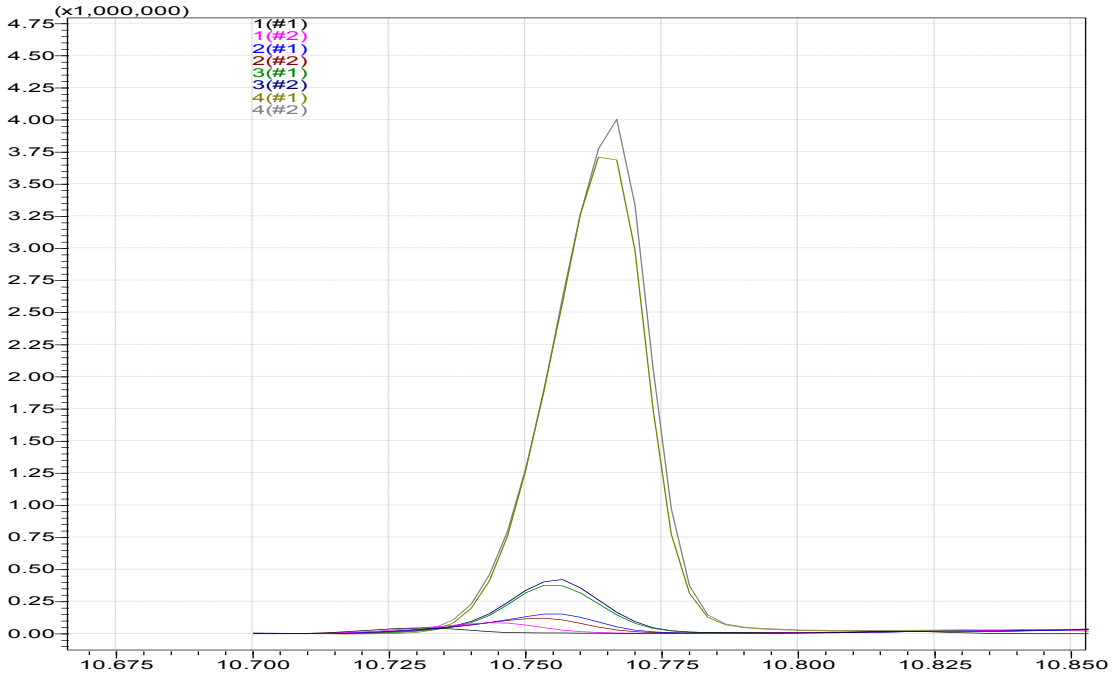
Statistički podaci:

Mean RF : 26321.6
RF SD : 36,682.03
RF %RSD : 139.3609

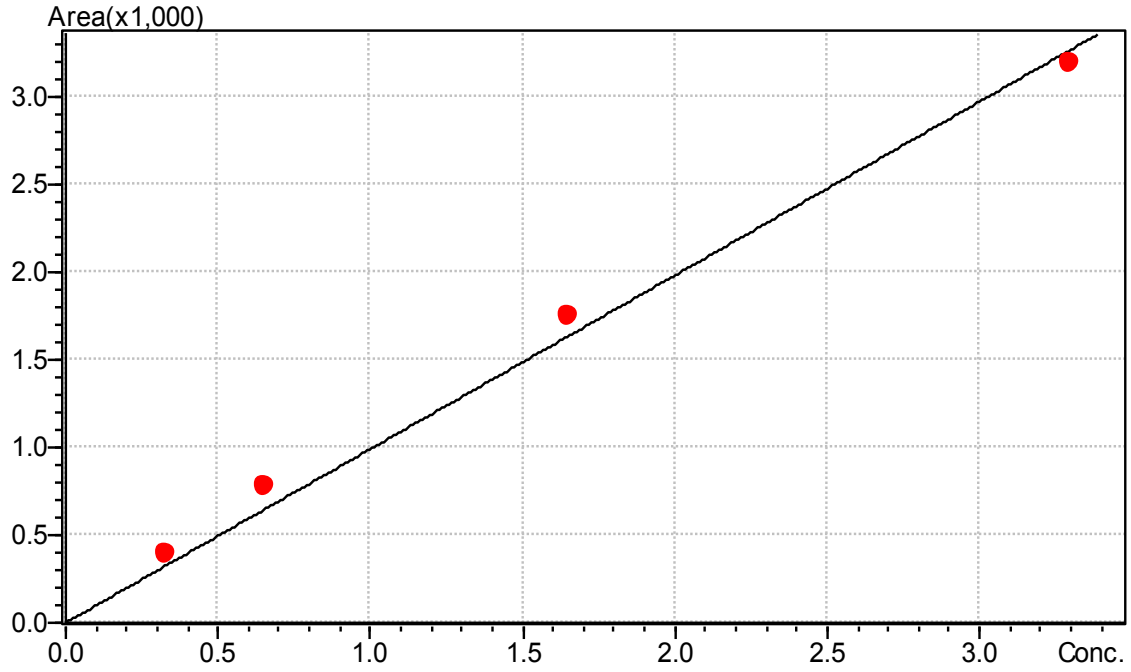
Jednadžba kalibracijskog pravca: Y = 4994.193X + 0.0 , b (nagib pravca)= 4994.193

R^2 = 0.9999731, R = 0.9999865

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 21. Usporedba različitih koncentracija kotinina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.



Slika 22. Baždarna krivulja 3-hidroksikotinina u koncentracijskom području od 0,3-0,33 ng/mL.

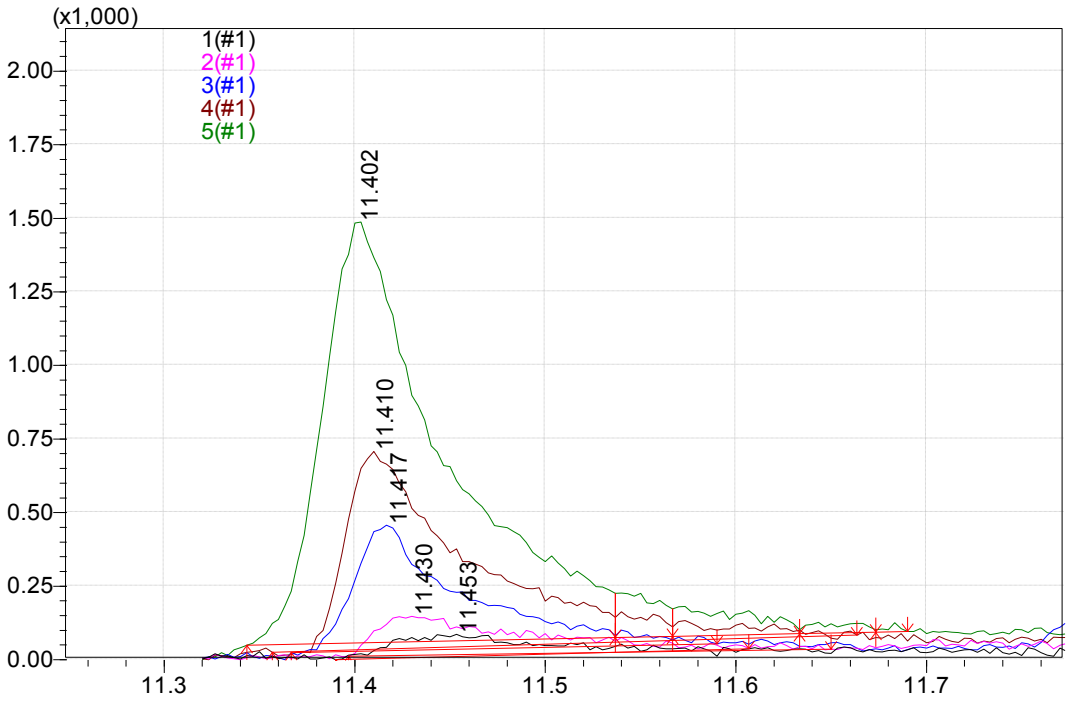
Statistički podaci:

Mean RF : 1092.424
RF SD : 99.16236
RF %RSD : 9.077275

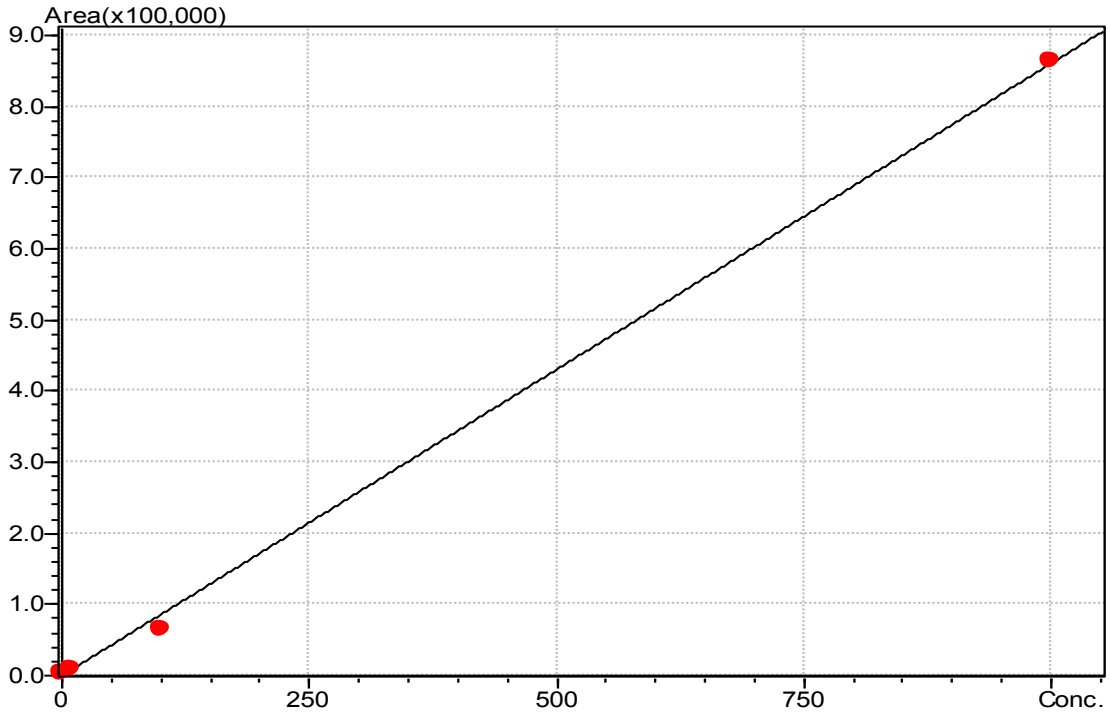
Jednadžba kalibracijskog pravca: Y = 992.9837 X + 0.0, b (nagib pravca)= 992.9837

R^2 = 0.9982508, R = 0.999125

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 23. Usporedba različitih koncentracija 3-hidroksikotinina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.



Slika 24. Baždarna krivulja 3-hidroksikotinina u koncentracijskom području od 0-1000 ng/mL.

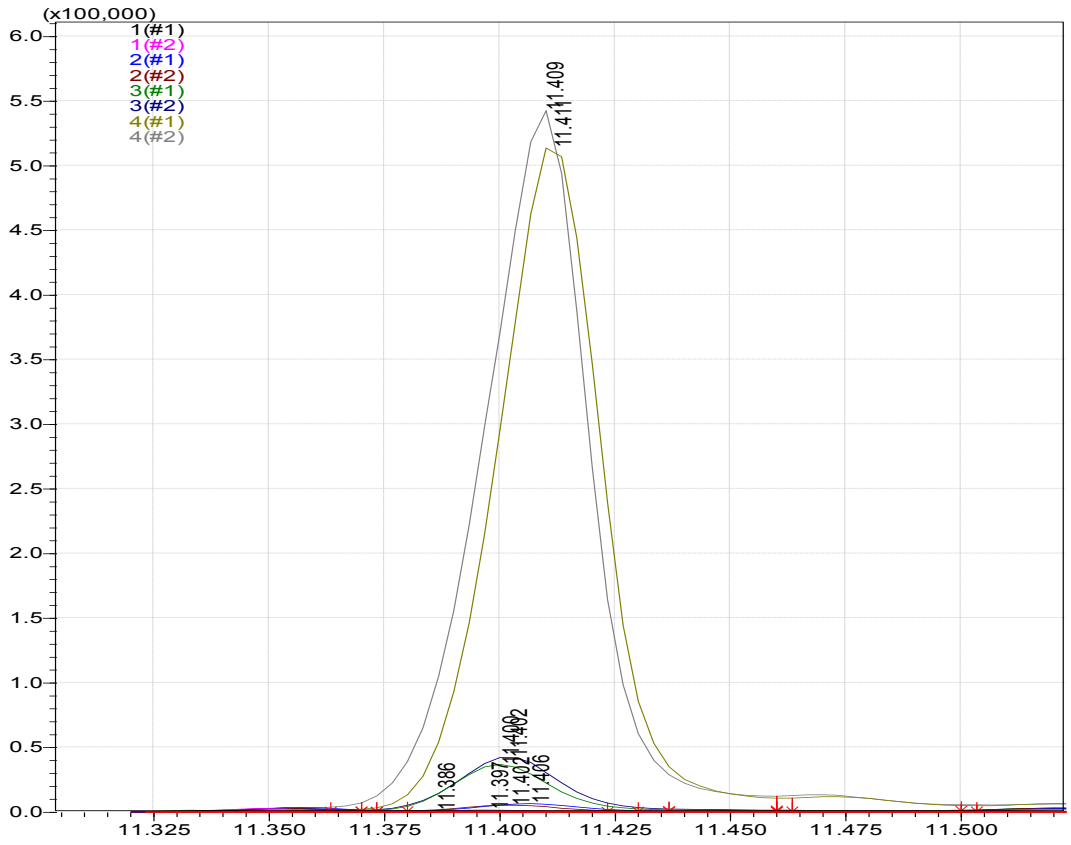
Statistički podaci:

Mean RF : 1101.569
RF SD : 590.8458
RF %RSD : 53.63675

Jednadžba kalibracijskog pravca: Y = 860.7555X + 0.0 , b (nagib pravca)= 860.7555

R^2 = 0.9993568, R = 0.9996784

Parametar R (koeficijent korelacije) kalibracijske krivulje ZADOVOLJAVA kriterij prihvatljivosti (R > 0,995).



Slika 25. Usporedba različitih koncentracija 3-hidroksikotinina pri čemu najveća koncentracija daje najveći odziv na kromatogramu.

2) Ponovljivost

Pri koncentraciji od 333 ng određeni su u tablicama ispod (Tablice 5, 6 i 7.) statistički podaci izračunatih retencijskih vremena (RT) i površina ispod kromatografskih pikova (Area) za nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin:

Tablica 5 . Izračunate vrijednosti retencijskog vremena i površine ispod pika za Nikotin

Injection no.	RT	Area
1	7,622	61487
2	7,622	66464
3	7,623	61648
4	7,621	60525
5	7,622	59166
6	7,620	59218
Mean Area	7,622	61418
SD	0,001	2691,8
RSD%	0,0136	4,3827

Tablica 6. Izračunate vrijednosti retencijskog vremena i površine ispod pika za Kotinin

Injection no.	RT	Area
1	10,763	30371
2	10,761	30276
3	10,761	27922
4	10,761	27892
5	10,761	27200
6	10,761	26587
Mean Area	10,761	28375
SD	0,0008	1588,3
RSD%	0,0076	5,5977

Tablica 7. Izračunate vrijednosti retencijskog vremena i površine ispod pika za 3-hidroksikotinin

Injection no.	RT	Area
1	11,395	10794
2	11,390	10150
3	11,393	9342
4	11,394	9131
5	11,413	9341
6	11,415	9757
Mean Area	11,400	9752,5
SD	0,011	627,19
RSD%	0,0964	6,4311

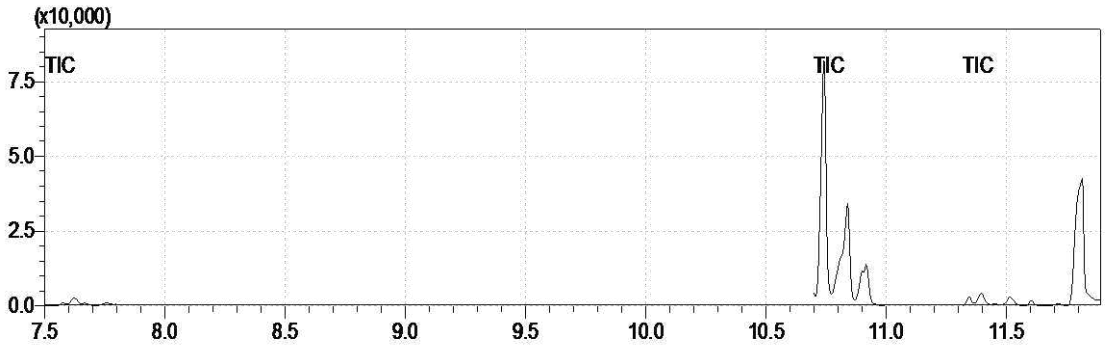
Ponovljivost mjerenja određivanja retencijskog vremena (RT) za nikotin iznosi: RSD=0,0136%, za kotinin iznosi: RSD=0,0076% i za 3-hidroksikotinin iznosi: RSD=0,0964%, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) za sva tri analita.

Ponovljivost mjerenja određivanja površine ispod pika (Area) za nikotin iznosi: RSD=4,3827 %, za kotinin iznosi: RSD=5,5977% i za 3-hidroksikotinin iznosi: RSD=6,4311% što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %) za sva tri analita.

4.3. Kvantitativna analiza realnog biološkog uzorka urina nepušača i pušača

Uzorak 1: Nepušač

Na slici ispod prikazan je kromatogram uzorka 1 (Slika 26.) na kojemu je dokazano prisustvo sve tri ispitivane tvari sa karakterističnim retencijskim vremenima: NIKOTIN (RT=7.623), KOTININ (RT=10.742) i 3-OH-KOTININ (RT=11.396). Osoba je nepušač i rijetko boravi u pušačkim prostorima.



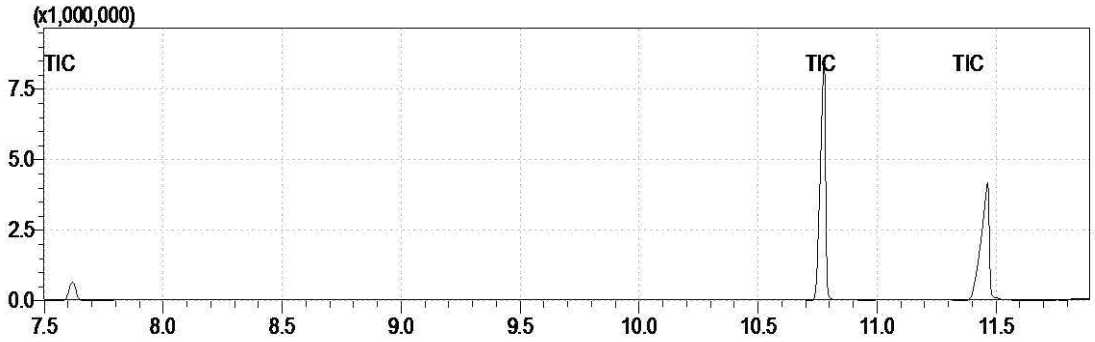
Slika 26. Prikaz dobivenog kromatograma analize biološkog uzorka broj 1 (Nepušač).

Tablica 8 . Rezultati izračunatih koncentracija pri pripadajućim retencijskim vremenima za uzorak 1.

Tvar	Koncentracija	Retencijsko vrijeme
Nikotin	0.878 ng/mL	7.623 min
Kotinin	23.084 ng/mL	10.742 min
3-OH-Kotinin	8.265 ng/mL	11.396 min

Uzorak 2: Pušač

Na slici ispod (Slika 27.) se nalazi kromatogram uzorka 2. sa tri pripadajuća signala sa karakterističnim retencijskim vremenima: NIKOTIN (RT=7.618), KOTININ (RT=10.777) i 3-OH-KOTININ (RT=11.465). Pušač spada u kategoriju teških pušača (>20 cigareta na dan) .



Slika 27. Prikaz dobivenog kromatograma analize biološkog uzorka broj 2 (Pušač).

Tablica 9 . Rezultati izračunatih koncentracija pri pripadajućim retencijskim vremenima za Uzorak 2.

Tvar	Koncentracija	Retencijsko vrijeme
Nikotin	227.481 ng/mL	7.618 min
Kotinin	2660.835 ng/mL	10.777 min
3-OH-Kotinin	11962.567 ng/mL	11.465 min

5. RASPRAVA

Uspješno je razvijena metoda na plinskom kromatografu s masenim detektorom (GC-MS) za kvantitativno i kvalitativno određivanje nikotina i njegovih metabolita kotinina i 3-hidroksikotinina u uzorku urina.

Baždarne krivulje za simultano dokazivanje nikotina, kotinina i 3-hidroksi-kotinina su konstruirane pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem razrijeđenih otopina referentnih standarda u urinu pri koncentracijama 0,3 ng/ml–1000 ng/mL. Predobrada uzorka za analizu GC-MS provodila se ekstrakcijom tekuće-tekuće (engl. Liquid-liquid Extraction, LLE) toxi A sustavom te zatim otapanjem dobivenog suhog ekstrakta u diklormetanu i uparavanjem do suha.

U ovome radu provedena je djelomična validacija navedene metode, te su određivani parametri: linearnost, preciznost i ponovljivost. Linearnost metode je potvrđena izradom baždarnih krivulja u tri koncentracijska područja standardnih otopina nikotina, kotinina i 3-hidroksikotinina, s najmanje tri mjerenja po koncentracijskom području. Iz dobivenih podataka izračunata je ovisnost odziva kromatografa (površine ispod kromatografskog pika) o koncentraciji analita i koeficijenti nagiba pravca (b). U ovom radu linearnost je prikazana grafički tako što je određena matematička jednadžba dobivenog pravca te je izračunat koeficjent korelacije R. Dobiveni koeficijent korelacije za sva koncetracijska područja sva tri analita iznosi više od 0,999 što zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($R \geq 0,9$).

Preciznost pri uvjetima ponovljivosti je određena mjerenjem retencijskih vremena i površina ispod kromatografskog pika od šest uzastopnih injektiranja uzoraka kontrolne standardne otopine za sva tri analita (nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin) čija je koncentracija 333 ng/mL. Ponovljivost mjerenja retencijskog vremena (RT) za sva tri analita izračunatog GC-MS metodom iznosi: RSD (nikotin)= 0,0136 %, RSD (kotinin)= 0,0076% i RSD (3-hidroksikotinin) = 0,0964%, a ponovljivost mjerenja površine ispod kromatografskog pika iznosi : RSD (nikotin)= 4,3827 %, RSD (kotinin)= 5,5977% i RSD (3-hidroksikotinin)= 6,4311%, što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (RSD < 10 %). Rezultati provedenih validacijskih parametara potvrđuju izbor provedene metode i pripreme uzoraka.

Nakon validacije navedene metode, slijedila je primjena na realne uzorke urina. Određene su koncentracije nikotina i navedenih metabolita u dva uzorka urina, pri čemu jedan uzorak pripada nepušaču, a drugi kroničnom, teškom pušaču (više od 20 cigareta na dan). Detektirani nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin potvrđeni su usporedbom dobivenih spektara

masa sa spektrima masa iz baze podataka, a njihove masene koncentracije izračunate su pomoću prethodno određenih baždarnih krivulja. Analizom rezultata uzoraka 1 i 2 (nepušača i kroničnog pušača), u oba uzorka detektirana su sva tri analita od interesa (nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin) pri čemu je u uzorku 1 (nepušač) koncentracija kotinina bila najviša, a u uzorku 2 (kronični pušač) koncentracija 3-hidroksikotinina je bila najviša. Najobilniji metabolit u urinu nakon potpunog metabolizma je 3-hidroksikotinin jer se kotinin na kraju biotransformacije većinski pretvara u njega. Zbog toga smo kod uzorka 2 koji je kroničan pušač dobili najvišu koncentraciju 3-hidroksikotinina i vrlo visoku koncentraciju kotinina. Kod uzorka 1 se očito radi o nedavnom izlaganju pasivnom pušenju te se kotinin još nije stigao u potpunosti metabolizirati u 3-hidroksikotinin te je zato njegova koncentracija najviša. U oba uzorka koncentracija nikotina je znatno manja od njegovih metabolita što nam dokazuje kako se nikotin brzo metabolizira u ljudskom organizmu te mu je poluživot 2-3 h dok kotininu i 3-hidroksikotininu može biti i do 20h. Zbog rezultata uzorka 1 gdje je osoba nepušač ne boravi često u zadimljenim prostorima poput kafića, klubova i slično, a u zadnjih 48 sati negira bilo kakav boravak u zadimljenom prostoru i izloženost duhanu vidi se značajan utjecaj pasivnog pušenja. Unatoč okolonostima kod uzorka 1. nikotin i njegovi metaboliti su svejedno detektirani.

Zbog toga treba provesti daljna istraživanja i određivanja koncentracija nikotina i metabolita u biološkim uzorcima urina kod nepušača koji su izloženi pasivnom pušenju te usporediti stupanj odnosno vrijeme izloženosti zadimljenim prostorijama sa koncentracijama u organizmu čovjeka.

6. ZAKLJUČAK

1. Određena je optimalna GC-MS metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu nikotina i njegovih metabolita kotinina i 3-hidroksikotinina u biološkom uzorku urina pomoću izrade baždarnih krivulja otopina referentnih standarda.

2. Provođenjem validacije analitičke metode za određivanje nikotina i njegovih metabolita potvrđeno je da odabrani validacijski parametri (linearnost, preciznost i ponovljivost) zadovoljavaju postavljene kriterije prihvatljivosti.

3. Kvalitativno i kvantitativno je dokazano prisutvo nikotina i njegovih metabolita u uzorku nepušača i kroničnog pušača.

4. Potrebno je provesti daljnja ispitivanja utjecaja pasivnog pušenja na nepušače pomoću analize koncentracija nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima urina pri različitim stupnjevima izloženosti duhanskom dimu.

7. POPIS LITERATURE

(1) Sutlović D. i sur. Druga sredstva ovisnosti. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 96.

(2) Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ: Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. p. 457.

(3)https://www.123rf.com/photo_105507151_nicotiana-tabacum-cultivated-tobacco-.html (pristup: 07.09.2019.).

(4) Ferner R. Handbook of Drug Interactions: a Clinical and Forensic Guide, 2nd edn. *Br J Clin Pharmacol*. 2012;74(5):893.

(5) Rojnić Palavra I, Pejnović Franelić I, Musić Milanović S, Puljić K. PASIVNO PUŠENJE – AKTIVNI UBOJICA. Liječnički vjesnik [Internet]. 2013 ;135(11-12).

(6) Medić-Šarić, Marica; Rendić, Slobodan: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika, Medicinska naklada; 2013. p. 378.

(7) Henningfield JE, Calvento E, Pogun S (2009). Nicotine Psychopharmacology. Springer. pp. 35, 37. ISBN 978-3-540-69248-5. (pristup: 08.09.2019.).

(8) Bentley MC, Abrar M, Kelk M, Cook J, Phillips K. Validation of an assay for the determination of cotinine and 3-hydroxycotinine in human saliva using automated solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1999 Feb 19;723(1-2):185-94.

(9) Feng S, Cummings O, McIntire G. Nicotine and cotinine in oral fluid: Passive exposure vs active smoking. *Pract Lab Med*. 2018;12:e00104. Published 2018 May;75(3) 78-102.

(10) Paci E, Pigini D, Bauleo L, Ancona C, Forastiere F, Tranfo G. Urinary Cotinine Concentration and Self-Reported Smoking Status in 1075 Subjects Living in Central Italy. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Apr 19;15(4):804.

(11) Johnstone E, Benowitz N, Cargill A, Jacob R, Hinks L, Day I, Murphy M, Walton R. Determinants of the rate of nicotine metabolism and effects on smoking behavior. Clin Pharmacol Ther. 2006 Oct;80(4):319-30.

(12) Tanner, J. A., Novalen, M., Jatlow, P., Huestis, M. A., Murphy, S. E., Kaprio, J., Tyndale, R. F. Nicotine metabolite ratio (3-hydroxycotinine/cotinine) in plasma and urine by different analytical methods and laboratories: implications for clinical implementation.

Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 2015 Sep;24(8).

(13) Qian Wang, Yue Yuan, Mingxin Li, Yaqian Chen, Yi Man,Michel Dardc and Xiaoli Zou, Application of solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for nicotine and cotinine measurement in human urine combined with hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry,2017 Jun;27(6):765-897.

(14) Man CN1, Gam LH, Ismail S, Lajis R, Awang R. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spectrometry. 2006 Sep,352(2) 94-345.

(15) Adnan Massadeh, Ahmad Gharaibeh, Khaled W Omari, A Single-Step Extraction Method for the Determination of Nicotine and Cotinine in Jordanian Smokers' Blood and Urine Samples by RP-HPLC and GC-MS, February 2009;47(2):170-7 .

(16) http://slideplayer.com/slide/6246629/ (pristup:10.09.2019).

(17) Juhascik MP, Jenkins AJ. Comparison of liquid/liquid and solid-phase extraction for alkaline drugs. J Chromatogr Sci. 2009;47(7):553-7.

(18) http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0912.htm (pristup:10.09.2019).

(19) Njegomir Radić, Lea Kukoč Modun, Uvod u analitičku kemiju, Redak, 2013. p.237-250.

(20) Pravallika S. Gas Chromatography: A Mini Review. Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016;5(2):2347-2340.

(21) Masena spektrometrija. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža [Internet] 2018 [cited 2018 May 20] Available from: http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=39268.

(22) http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=39268 (pristup:10.09.2019).

(23) United Nations Office on Drugs Crime (UNDOC), Recommended methods for the

Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials. 2015:

UNDOC, Vienna. (pristup 10.2.2018.).

(24) Pravallika S. Gas Chromatography: A Mini Review. Research and Reviews: Journal of

Pharmaceutical Analysis. 2016;5(2):2347-2340.

(25) International Committee for Harmonisation (http://www.ich.org) ICH – Guidance for Industry Q2(R1) –Validation of Analytical Procedures – Methodology.

(26) How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Verification Prepared by AOAC INTERNATIONAL.

(27) C. M. Riley, T. W. Rosanske, Development and validation of analytical methods, Pergamon 2005 (pristup 10.2.2018.).

(28) Lazarić, K., Laboratoriji, Validacija analitičkih metoda, osnovna načela.p.30-55.

(29) IUPAC Technical Report: Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis,Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 835-855, 2002.

(30) Sutlovic D. i sur. Plinska kromatografija-spektrometrija masa. Osnove forenzične toksikologije. Split: Tisak; 2011. p. 357.

(31) Sutlovic D. i sur. Ekstrakcija tekuće-tekuće .Osnove forenzične toksikologije. Split: Tisak; 2011. p. 342.

(32) Sutlović D. i sur. Analiza bioloških uzoraka. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 337.

(33) Sutlović D. i sur. Kvantitativna analiza. In: Sutlović D, editor. Osnove forenzične toksikologije. Split: Redak; 2011. p. 366.

8. SAŽETAK

Naslov rada: Određivanje koncentracije nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima

Ciljevi istraživanja: Razviti metodu za određivanje koncentracija nikotina i njegovih metabolita i biološkom uzorku urina pomoću izrade baždarnih krivulja otopina referentnih standarda poznatih koncentracija te pomoću njih izračunati nepoznate koncentracije u uzorcima urina u kojima su koncentracije nikotina i metabolita nepoznate. Odrediti validacijske parametre navedene metode.

Ustroj istraživanja: Eksperimentalna studija

Mjesto istraživanja: Kemijsko-toksikološki laboratorij Kliničkog odjela za sudsku medicinu Zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, Kliničkog bolničkog centra u Splitu.

Materijal i metode: Otopine za izradu baždarne krivulje dobivene su serijskim razrjeđivanjem referentnih standarda, prvo u metanolu te zatim u uzorku urina, nakon čega su uzeti jednaki volumeni istih koncentracija sve tri tvari te smo pokrili veće koncentracijsko područje. MIX otopine standarda su ekstrahirani metodom tekuće-tekuće (LLE), razrijeđeni kloroformom i analizirani plinskom kromatografijom s masenim spektrometrom snimanjem ukupne ionske struje (TIC). Nakon izrade baždarnih krivulja, slijedi njihova primjena u određivanju koncentracije nikotina i metabolita u realnim uzorcima urina.

Rezultati: Umjerne krivulje za nikotin, kotinin i 3-hidroksikotinin uspješno su napravljene pomoću dobivenih signala ciljanim mjerenjem otopina standarda u urinu pri koncentracijama od 0,3-1000 ng/mL. Dokazana je linearnost metode sa koeficjentom korelacije $R>0,99$. Ponovljivost također zadovoljava kriterij prihvatljivosti ($RSD<10\%$). Masene koncentracije detektiranih nikotina i njegovih metabolita u uzorcima nepoznatih koncentracija izračunate su pomoću prethodno izrađenih baždarnih krivulja.

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja potvrdili su izbor GC-MS tehnike u kombinaciji sa prethodnom LLE ekstrakcijom željenih analita za kvantitativno određivanje nikotina i njegovih metabolita u biološkim uzorcima urina. Provedeni validacijski faktori zadovoljavaju kriterij prihvatljivosti. Dokazana je prisutnost nikotina i metabolita i u nepušača čime se pokazuje veliki utjecaj pasivnog pušenja na ljude. Daljna istraživanja bi trebala uključivati veliki broj nepušača i razne uvjete izlaganja pasivnom pušenju.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Determination of the concentration of nicotine and its metabolites in biological samples

Objectives: The objective of this study was to develop a method for simultaneous concentration determination of nicotine and its metabolisms in biological urine sample by making calibration curves using reference standard solutions of known concentrations to calculate unknown concentrations in urine samples. Determine the validation parameters of the specified method.

Design: Experimental study

Settings: Laboratory of Toxicology, Department of pathology, forensic medicine and cytology, University Hospital of Split.

Material and Methods: Calibration solutions were obtained by serial dilution of the reference standards, first in methanol and then in a urine sample, after which equal volumes of the same concentrations of all three substances were taken and a larger concentration area was covered. MIX solutions of the standards were extracted by liquid-liquid (LLE) method, diluted with chloroform and analyzed by total ion current (TIC) gas chromatography with mass spectrometer. After the preparation of the calibration curves, their application is followed in the determination of the concentration of nicotine and metabolites in real urine samples.

Results: Calibration curves for nicotine, cotinine, and 3-OH-cotinine were successfully constructed using the obtained signals by the targeted measurement of standard solutions in urine at concentrations of 0.3-1000 ng/mL. The linearity of the method with a correlation coefficient R> 0.99 was proved. Repeatability also meets the eligibility criterion (RSD <10%). The mass concentrations of the detected nicotine and its metabolites in samples of unknown concentrations were calculated using previously prepared calibration curves.

Conclusion: The results of this study confirmed the choice of GC-MS technique in combination with previous LLE extraction of desired analytes for the quantitative determination of nicotine and its metabolites in biological urine samples. The validation factors performed satisfy the eligibility criterion. The presence of nicotine and metabolites in non-smokers has also been demonstrated, demonstrating the high impact of secondhand smoke on humans. Further studies should include a large number of nonsmokers and various conditions of exposure to secondhand smoke.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

IME I PREZIME: Ivana Kurbaša

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 06.09.1995, Split, Republika Hrvatska

DRŽAVLJANSTVO: Hrvatsko

ADRESA I MJESTO STANOVANJA: Cesta dr. Franje Tuđmana 731, Kaštel Stari

E-MAIL: ivana.kurbasa69@gmail.com

BROJ MOBILNOG TELEFONA: 097 615 7287

OBRAZOVANJE

Rujan 2014- Rujan 2019 .	Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija
Rujan 2010 - lipanj 2014	III. Gimnazija Split(Matematičko-prirodoslovna)
Rujan 2002- lipanj 2010	Osnovna škola prof. Filipa Lukasa,Kaštel Stari

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

25.02.2019. – 30.08.2019. Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna Kaštel Sućurac

RAČUNALNE VJEŠTINE:

Vješto baratanje Microsoft Office alatima (Word, Excel, PowerPoint)

Osnove programiranja u C++ i C #

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski jezik

Ostali jezici	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski jezik	C1	C1	C1	C1	C1
Njemački jezik	A1	A1	A1	A1	A1
Španjolski jezik	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1/2: Početnik - B1/2: Samostalni korisnik - C1/2 Iskusni korisnik

Zajednički europski referentni okvir za jezike