

DETERMINACIÓN DE NICOTINA EN CIGARRILLOS APLICANDO LA TÉCNICA DE LA SEGUNDA DERIVADA

José Estrada¹, Rodolfo Pumachagua^{1*}

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se ha determinado nicotina en muestras de tabaco, correspondientes a marcas de cigarrillos nacionales, utilizando la destilación por arrastre de vapor y posterior determinación mediante espectrofotometría derivativa aplicando la técnica de la segunda derivada. El método de extracción es el sugerido por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Sin embargo, para el análisis y expresión final de resultados, en este estudio se ha optado por utilizar la espectrofotometría derivativa por su simplicidad, sin requerir de una corrección de fondo. Los resultados están expresados en mg/L y % de alcaloides totales, y como nicotina.

Palabras clave: nicotina, espectrofotometría derivativa, alcaolide.

CIGARETTE NICOTINE DETERMINATION APPLYING THE SECOND DERIVED TECHNIQUE

ABSTRACT

In the present work we have evaluated nicotine in tobacco samples corresponding to local cigarette brands by using steam distillation and to later evaluation by derivative spectrophotometry using the second derivative technique. We uses here the extraction method suggested by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). However, for the final analysis and expression of results we have chosen the derivative spectrophotometry because of its simplicity; it doesn't need to background correction and, its to better accuracy because of the uses of to calibration curves which differs from the conventional spectrophotometric method of determination suggested by the AOAC. The results plows expressed in mg/L and % of total alkaloids and nicotine.

Key words: nicotine, derivative spectrophotometry, alkaloid.

INTRODUCCIÓN

La nicotina es el principal alcaolide presente en la mayoría de los cigarrillos comerciales; sin embargo, constituye sólo uno de los más de 4000 compuestos hallados en el humo del tabaco.

El contenido real de nicotina en el tabaco puede variar de 0,2 a 5,0%, pero en general es de 1 a 2% en los tabacos para fumar; por otra parte, se ha encontrado que pocos de esos productos contienen más del 0,2% de alcaloides con un grupo amino secundario.

¹ Laboratorio de Química Analítica Instrumental, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Av. Bolívar 165, Pueblo Libre, Lima – Perú.
Telefax: 461 – 0741, e-mail: rpumachagua@hotmail.com

La espectrofotometría derivativa, implementada a inicios de los años 50, permite obtener espectros derivados a partir de los correspondientes espectros fundamentales, facilitando la determinación precisa de los máximos llanos y el aislamiento de hombros y señales débiles de un ruido de fondo indeseado.

Puede considerarse al espectro fundamental de un extracto de nicotina de una muestra de tabaco como un buen ejemplo de espectro al cual se le puede aplicar satisfactoriamente la técnica de la segunda derivada y, poder así evaluar con mayor exactitud el contenido de nicotina y nor-nicotina presentes.

La (S)-(-)-nicotina (**1**) o simplemente “nicotina”, es el principal alcaloide del tabaco (*Nicotiana tabacum*), del cual las variedades *Bright*, *Burley* y *Oriental* son las principales materias primas de la industria del tabaco a nivel mundial¹. La nicotina ha sido muy estudiada; puede existir bajo tres formas en la mezcla proveniente de un cigarrillo^{2,3}: nicotina no protonada (**1**), nicotina mono-protonada (**2**) y nicotina di-protonada (**3**)⁴. (En todas estas estructuras, “Z” se refiere a un anión en general, no necesariamente a uno de los que aparece en la figura 1).

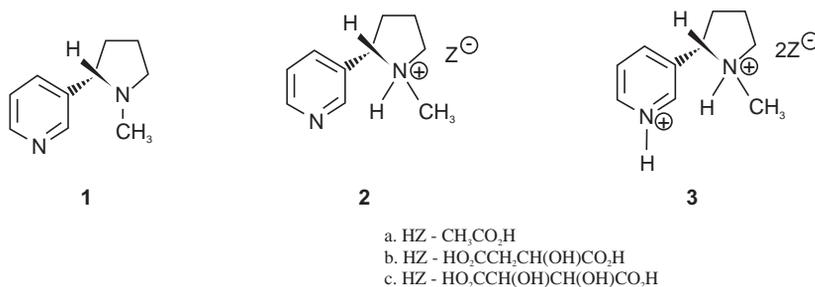


Figura 1. Moléculas de nicotina no protonada, mono- y di-protonada.

Sólo una parte de la nicotina presente en el tabaco es transportada al humo del cigarrillo, habiéndose identificado más de 30 bases relacionadas estructuralmente con la nicotina en el humo⁵. La mioscina es el principal producto de la descomposición de la nicotina a temperaturas mayores de 300 C en aire⁶ y por encima de 600 C en una atmósfera inerte⁷.

El término “transferencia de nicotina a la fase gaseosa” no significa que toda la nicotina permanece en esta fase durante o después del encendido de un cigarrillo o la acción de fumar; en vez de ello, se estima que el proceso térmico inicial lleva a la nicotina a la fase gaseosa cerca de la fuente de calor; seguidamente, el viaje del humo a todo lo largo del cigarrillo hacia el filtro, ocasiona una condensación (o precipitación) de la mayor parte de la nicotina fuera de la fase gaseosa y en forma de aerosol^{8,9}.

A medida que la nicotina viaja a través del cigarrillo durante una aspiración, se sabe que una parte de ella se condensa sobre el tabaco a medida que la temperatura del humo del cigarrillo disminuye^{9,10}; así, existe un flujo importante de nicotina en el tabaco en regiones de

bajas temperaturas de un cigarrillo durante el proceso de fumar, en vez de una volatilización de ésta fuera del tabaco; en consecuencia, lo que realmente ocurre en estas regiones de baja temperatura es una deposición neta de nicotina.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos y reactivos

Se utilizó un Espectrofotómetro Ultravioleta/Visible SHIMADZU UV-1601 de doble haz, acoplado a una computadora con el software correspondiente para el análisis por derivadas.

Se utilizaron hidróxido de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico y ácido silicotúngstico, todos de grado reactivo, en el procedimiento de extracción de la nicotina de las muestras de cigarrillos.

Para la preparación de los estándares de nicotina, se utilizó L()-nicotina PESTANAL con una densidad de 1,01 g/ml y una pureza (CG) del 99,3%, suministrada por los laboratorios Riedel-de Hæn.

Marcas analizadas

Las marcas que han sido analizadas son:

- muestra M1: cigarrillos Ducal
- muestra M2: “ Hamilton
- muestra M3: “ Premier
- muestra M4: “ Premier Light

Extracción de la nicotina

A 0,5 gramos de muestra se le añadió 25 mL de una solución de NaOH al 43%(w/v) saturada con NaCl dentro del balón de destilación; esta constituye el medio de extracción de los alcaloides totales volátiles, y a la salida del refrigerante se coloca un vaso de 1 L conteniendo 15 mL de una disolución de HCl 3,3N en la cual se irá colectando el destilado, una vez obtenido el volumen apropiado (alrededor de 900 – 950 mL), ésta se coloca en una fiola de 1L y se completa a volumen con agua destilada, si fuera necesario; el extracto es guardado en envases de plástico de 1L de capacidad y refrigerado a 7°C hasta el momento de su uso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método empleado

El procedimiento seguido para la extracción de nicotina a partir de muestras de cigarrillos es la parte D del Método de Destilación del Método Oficial AOAC 960.07 ¹¹ con algunas modificaciones. Al utilizar un exceso de cloruro de sodio en la solución de hidróxido de sodio, otros alcaloides presentes, como la nor-nicotina, serán igualmente destilados si se encuentran presentes en la muestra.

Determinación del rango óptimo de peso de muestra

Se realizaron pruebas preliminares para determinar el rango óptimo de peso de muestra.

Debido a que los cigarrillos correspondientes a la muestra M3 contienen mayor cantidad de nicotina que la muestra M1 (de acuerdo a la información del fabricante), se realizaron ensayos adicionales para determinar el peso de muestra adecuado para un volumen de destilado de 1L en productos comerciales con contenidos similares de nicotina.

De esta forma, se estableció un peso de muestra de 0,5 g de tabaco para todas las marcas de cigarrillos analizadas, ya sea que éstas contengan un bajo contenido de nicotina o uno alto.

Determinación espectrofotométrica de la nicotina

El procedimiento seguido para la evaluación cuantitativa de los extractos de nicotina obtenidos se detalla en la parte E del Método Oficial AOAC 960.07, para la determinación de alcaloides totales en tabaco (como nicotina)¹¹

El espectro fundamental de cada uno de los extractos de nicotina presentó fuerte absorción entre 250 y 265 nm. Un Espectro representativo se muestra en la figura 2.

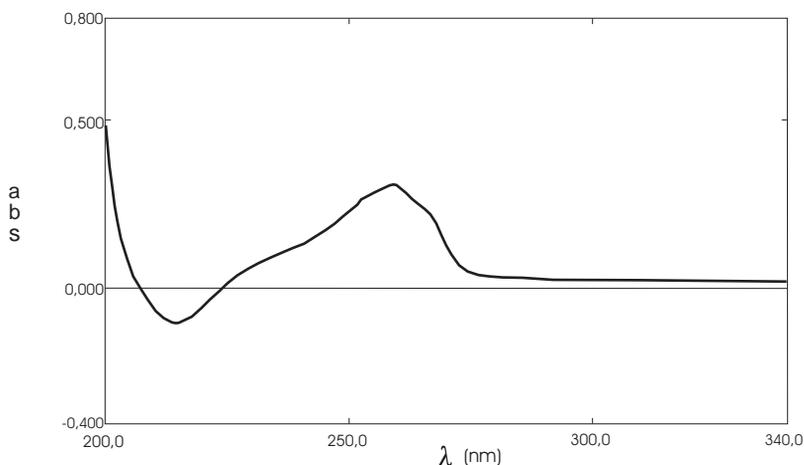


Figura 2. Espectro de orden cero representativo de un extracto de nicotina.

Tabla 1. Valores de absorbancia observada para los 10 extractos de nicotina de las 4 muestras analizadas.

N extracto	M1	M2	M3	M4
1	0,281	0,302	0,792	0,256
2	0,316	0,299	0,865	0,248
3	0,306	0,300	0,935	0,229
4	0,283	0,303	0,887	0,236
5	0,282	0,290	0,861	0,243
6	0,281	0,292	0,842	0,250
7	0,284	0,294	0,824	0,240
8	0,288	0,297	0,836	0,247
9	0,297	0,299	0,888	—
10	0,302	0,301	0,879	—
x	0,292	0,298	0,861	0,244

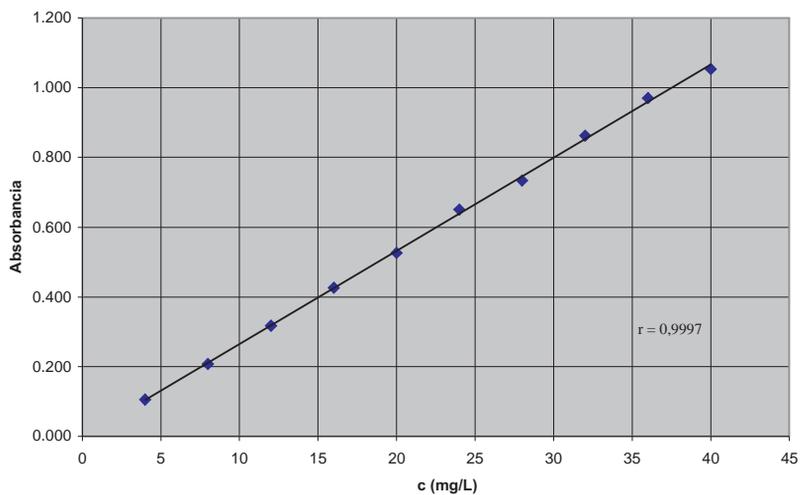


Figura 3. Curva de calibración de la nicotina mostrando los puntos individuales correspondientes a los 10 estándares de medición.

Curva de calibrado

La curva de calibrado se obtuvo con diez diferentes concentraciones de estándar y cada una con diez repeticiones. La gráfica se muestra en la figura 3.

Las muestras también fueron evaluadas en las mismas condiciones que los estándares. Los valores de absorbancia se muestran en la tabla 1.

Derivación de las curvas fundamentales de los extractos de nicotina

Los parámetros del software utilizado para el estudio por derivadas de los espectros de nicotina obtenidos (UVP Personal Spectroscopy Software Versión 3.5 de la corporación Shimadzu), fueron: orden de derivada (smoothing), delta lambda (DL), factor de graduación (scaling factor) y velocidad de escaneo (scan speed).

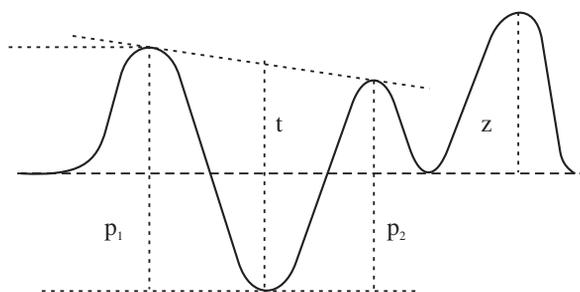


Figura 4. Evaluación de los espectros derivados. Método de la tangente (t), método pico-pico (p_1 y p_2) y método pico-cero (z).

Se derivaron las curvas fundamentales de los extractos de nicotina de las cuatro muestras analizadas y se evaluaron sus respectivos valores de absorbancia mediante el método pico-pico¹² en la región de longitudes de onda en la cual absorbe la nicotina (figura 4).

En teoría, la técnica de derivadas no requiere una corrección de fondo (background) para eliminar los valores de absorbancia atribuibles a otros compuestos que pudieran absorber en regiones de λ similares al de la nicotina, tal como ocurre en el método oficial de A.O.A.C.¹¹

En esta técnica, la aparición alternada de mínimos y máximos en las derivadas de orden par permite “restringir” el análisis tanto cualitativo como cuantitativo a regiones cada vez más estrechas de λ , evitándose de esta manera cualquier interferencia por parte de algún otro compuesto presente; al “aislar” el compuesto en mención, llámese nicotina, el valor de absorbancia obtenido mediante el método pico-pico aquí empleado resulta inalterable. Véanse los resultados finales de concentración obtenidos para las muestras mediante un análisis espectrofotométrico convencional sugerido por la A.O.A.C. y otro por la técnica de derivadas (2^{da}) realizado en este trabajo; todos ellos no difieren entre sí en más de 0,4 ppm, lo cual, indica una buena concordancia al menos entre estos dos métodos de análisis, no habiéndose requerido de corrección matemática alguna en la técnica de derivadas (figura 5).

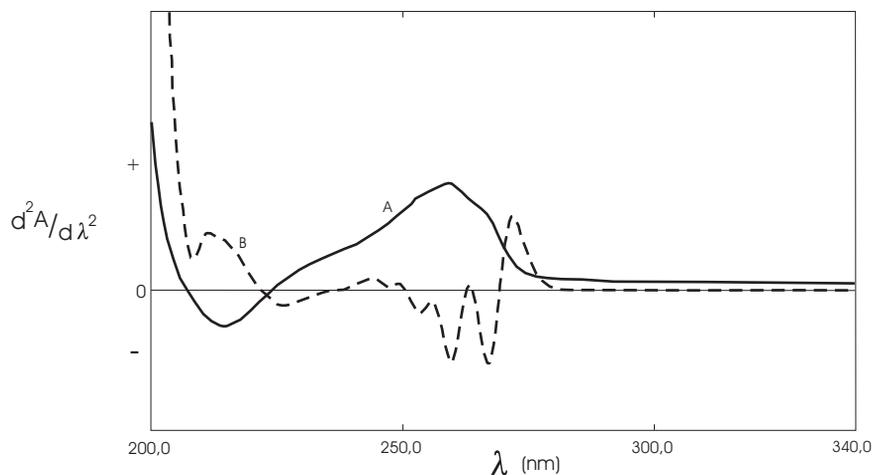


Figura 5. Espectro fundamental (A) y de segunda derivada (B) representativos de un extracto de nicotina.

En los espectros derivados correspondientes a las curvas de absorción de la muestra M3, no se observa la correlación esperada en cuanto a las alturas de los picos con la correspondiente curva fundamental; es sabido que estas alturas en un espectro derivado son directamente proporcionales a los valores de absorbancia en la curva fundamental. Este fenómeno observado puede ser atribuido a problemas de matriz en las muestras de tabaco de esta marca de cigarrillos en particular, que reporta el mayor contenido de nicotina.

El límite de detección del método espectrofotométrico haciendo uso de la técnica de la segunda derivada es de 1,06 mg/L.

En la tabla 2, se muestran los valores de absorbancia obtenidos luego de la derivación (método pico-pico) de los espectros de los 10 extractos de nicotina de las muestras M1, M2 y M4.

Tabla 2. Valores de absorbancia obtenidos luego de la derivación (2^{da}) de los espectros de los 10 extractos de nicotina de las muestras M1, M2 y M4 (método pico-pico).

N extracto	M1	M2	M4
1	0,219	0,218	0,180
2	0,211	0,228	0,177
3	0,217	0,218	0,166
4	0,210	0,231	0,169
5	0,212	0,211	0,174

(Sigue Tabla 2)

(Cont. Tabla 2)

N extracto	M1	M2	M4
6	0,209	0,216	0,179
7	0,208	0,218	0,171
8	0,211	0,220	0,176
9	0,217	0,221	—
10	0,221	0,223	—
\bar{x} =	0,214	0,220	0,174

Precisión del método

Los valores de absorbancia corregida promedio ¹¹ y de concentración, con sus respectivas desviaciones estándar y %RSD al igual que % de alcaloides totales (como nicotina) para las cuatro marcas de cigarrillos analizadas según el método propuesto por la A.O.A.C. y los obtenidos utilizando la técnica de la segunda derivada, muestran una concordancia aceptable. Los datos se observan en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 3. Valores de absorbancia corregida promedio, concentración y % de alcaloides totales (como nicotina) para las 4 marcas de cigarrillos analizadas según el método de la A.O.A.C.

Muestra	A'	s	%RSD	c(mg/L)	s	%RSD	%Alc _(nicot)
M1	0,245	0,0034	1,38	7,7	0,1200	1,59	1,5
M2	0,259	0,0059	2,28	8,1	0,2000	2,47	1,6
M3	0,401	0,0240	5,97	12,7	0,7800	6,12	2,5
M4	0,216	0,0096	4,43	6,8	0,3200	4,65	1,4

Tabla 4. Valores de concentración y % de alcaloides totales (como nicotina) para las tres marcas de cigarrillos analizadas según la técnica de la segunda derivada.

Muestra	c(mg/L)	S	%RSD	%Alc _(nicot)
M1	8,1	0,2072	0,94	1,6
M2	8,3	0,2058	0,94	1,7
M4	6,6	0,2170	0,99	1,3

CONCLUSIONES

- Los siguientes parámetros del software utilizado resultan los más apropiados al momento del estudio mediante la técnica de derivadas de la curva fundamental del extracto de nicotina:
 - Orden de derivada: 2^{da}
 - Delta lambda: 4,000
 - Factor de graduación: 40
 - Velocidad de escaneo: Fast
- En principio, puede afirmarse que la técnica de la segunda derivada resulta apropiada para el análisis de extractos de nicotina que posean un contenido menor al 2%; en otras palabras, resulta aconsejable para el análisis del contenido de nicotina en muestras de tabaco de marcas de cigarrillos “light” o similares.
- Los resultados obtenidos aplicando la técnica de la segunda derivada, reportan: 10,9 mg para la muestra M1; 11,6 mg para la M2, y 8,9 mg para la M4 de alcaloides volátiles totales.
- Los espectros de absorción ultravioleta de la nicotina, nor-nicotina y compuestos emparentados, resultan un medio adicional útil para caracterizarlos, proporcionan una mayor información para la corrección de las estructuras asignadas y suministran un posible método de análisis.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de La Vega, por todas las facilidades brindadas, para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

1. Akehurst, B.C. Tobacco, 2nd ed.; Longman: London, **1981**.
2. Schmeltz, I.; Hoffman, D. Nitrogen – Containing Compounds in Tobacco and Tobacco Smoke. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 295-311.
3. Stedman, R.L. The Chemical Composition of Tobacco and Tobacco Smoke. *Chem. Rev.* **1968**, *68*, 153-207.
4. Brunnehan, K.D.; Hoffman, D. The pH of Tobacco Smoke. *Food Cosmet. Toxicol.* **1974**, *12*, 115-124.
5. Bentley and Berry. The constituents of Tobacco Smoke: An Annotated Bibliography. Tobacco Manufacturers Standing Committee, London, **1959**, 19-24.
6. Kobashi, Y.; Hoshaku, H.; Watanabe, M. Pyrolysis of nicotine in air. *Nippon Kagaku Zasshi.* **1963**, *84*, 71-74.

7. Woodward, C.F.; Eisner, A.; Haines, P.G. Pyrolysis of Nicotine to Myosmine. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 914.
8. Crooks, E.L.; Lynn, D. The Measurements of Intrapuff Nicotine Yield. *Beitr. Tabakforsch. Int.* **1992**, 15, 75-85.
9. Jenkins, R.W., Jr.; Comes, R.A. Exogenous vs Endogenous Transfer of Nicotine During Smoking. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **1976**, 27, 323-324.
10. Houseman, T.H. Studies of Cigarette Smoke Transfer Using Radioisotopically Labeled Tobacco Constituents. Part II: The Transference of Radioisotopically Labeled Nicotine to Cigarette Smoke. *Beitr. Tabakforsch.* **1973**, 7, 142-147.
11. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Volume I. 16th Edition, **1995**.
12. Talsky, G.; Mayring, L.; Kreuzer, H. *Angewandte Chemie.* **1978**, 17(11), 785-799.