

## Стандартизация раствора сигаретного дыма для провокационного тестирования

О.В. Ищенко, М.Р. Хаитов, Т.Г. Гордиевич, И.П. Шиловский, Т.Н. Гончарова, М.В. Яцко  
Витебский государственный медицинский университет, Витебск

## Standardization of cigarette smoke extract for provocative test

A.U. Ishchanka, M.R. Khaitov, T.N. Hardziyevich, I.P. Shilovskiy, T.N. Goncharova, M.V. Yatsko  
Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

### Аннотация

**Цель исследования.** Определение концентрации никотина методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором для стандартизации водного раствора сигаретного дыма (РСД).

**Материалы и методы.** Анализ никотина в пробах РСД проводился на газовом хроматографе DANI Master GC, оснащённом пламенно-ионизационным детектором. Генерацию и сбор РСД проводили на запатентованном устройстве (пат. ВУ 11866 от 30.12.2018). Для получения РСД были использованы сигареты торговой марки «Kent», классические стандартного размера, с содержанием никотина 0,7 мг/сигарета, смол 8 мг/сигарета. В качестве аналитического стандарта использовали (-) – никотин,  $\geq 99\%$  (ГХ), внутреннего стандарта – гексадекан, 99,15% (г/г)  $\pm 0,3\%$  (г/г), растворителя – гексан Р, в качестве подвижной фазы использовался азот для хроматографии Р. Холостные растворы, градуировочные растворы и растворы испытуемого образца РСД вводили в газовый хроматограф по 1 мкл, получая не менее одной хроматограммы для каждого раствора. По окончании анализа регистрировали данные и проводили расчёт количественного содержания никотина в испытуемом образце РСД (мг/мл).

**Результаты.** Методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором установлена концентрация никотина в водном РСД, которая составила от 0,029 до 0,031 мг/мл.

**Заключение.** Разработан метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором для количественного определения содержания никотина в растворе сигаретного дыма. Метод подходит и применяется для анализа образцов водного раствора сигаретного дыма, благодаря чему становится возможным стандартизировать РСД по никотину для последующего использования в научно-исследовательских и диагностических целях.

### Ключевые слова

Никотин, водный раствор сигаретного дыма, стандартизация, газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором.

### Summary

**Aim.** Determination of nicotine concentration by gas chromatography with a flame ionization detector for standardization of cigarette smoke extract (CSE).

**Materials and methods.** Nicotine analysis in CSE samples was performed on a DANI Master GC gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. CSE generation and collection were performed on a patented device (patent BY 11866 dated 30.12.2018). Cigarettes were used as a source for CSE, with a nicotine content of 0,7 mg/cigarette, tar 8 mg/cigarette. The analytical standard used was (-) - nicotine,  $\geq 99\%$  (GC), the internal standard was hexadecane, 99,15% (g/g)  $\pm 0,3\%$  (g/g), the solvent was hexane P, and nitrogen for chromatography P was used as the mobile phase. Blank solutions, calibration solutions and solutions of the CSE test sample were introduced into the gas chromatograph at 1  $\mu$ l, obtaining at least one chromatogram for each solution. At the end of the analysis, the data were recorded and the quantitative content of nicotine in the test sample CSE (mg/ml) was calculated.

**Results.** Using gas chromatography with a flame ionization detector, the concentration of nicotine in CSE was determined to be from 0,029 to 0,031 mg/ml.

**Conclusion.** A method of gas chromatography with a flame ionization detector for quantitative determination of nicotine content in a CSE has been developed. The method is suitable and applicable for the analysis of CSE, making it possible to standardize the CSE for nicotine for subsequent use for research and diagnostic purposes.

### Keywords

Nicotine, cigarette smoke extract, standardization, gas chromatography with flame ionization detector.

Объективная диагностика аллергических заболеваний, включая гиперчувствительность, часто основывается на провокационных тестах *in vivo*. Оценка провокационных тестов осуществляется либо по уровням биомаркеров, характеризующих соответствующий иммунный ответ, либо по клиническим симптомам аллергии. Этот же приём провокации используется при оценке воздействия сигаретного дыма на животной модели либо человеку.

Сигаретный дым представляет собой сложную двухфазную смесь из твёрдых частиц и пара, содержащую в общей сложности более 7000 химических веществ, более 90 из которых были признаны вредными и потенциально вредными компонентами [1]. Стандартизация как аллергенов, полученных из натурального сырья, так и модельных растворов, имитирующих действие сигаретного дыма, необходима для воспроизводимости и верной интерпретации результатов провокационного тестирования [1,2].

Определение биомаркеров табака, рассмотрение их наличия и идентификация в биологических образцах может дать полезную информацию о воздействии сигаретного дыма в окружающей среде и на организм человека, а также позволит пересмотреть существующие аналитические подходы для отслеживания его потребления и воздействия. Никотин является одним из первых табачных биомаркеров, используемых для оценки воздействия табачного дыма в окружающей среде, из-за его высоких концентраций в организме и специфичности [1].

Никотин является наиболее распространённым алкалоидом, обнаруженным в табачном листе, и основной причиной табачной зависимости из-за его способности вызывать привыкание [3]. Несмотря на имеющиеся доказательства присутствия никотина в некоторых фруктах и овощах, например, помидорах и картофеле, разница в величине концентраций по сравнению с таковыми в сигаретном дыме или в заместительной никотиновой терапии (например, жевательной резинке или никотиновых пластырях) намного ниже [4,5].

Одна сигарета содержит в среднем от 7 до 24 мг никотина, средняя концентрация никотина в воздухе помещений для курения составляет от 1 до 10 мкг/м<sup>3</sup>, при этом от 0,3 до 3,0 мг никотина в расчёте на одну сигарету поглощается организмом через вдыхание или кожу [6] и находится в диапазоне от 20 до 50 нг/мл в плазме хронического курильщика в течение 24 часов [7].

Сорбция никотина через биологические мембраны зависит от рН и для слизистых оболочек

ускоряется при высоких значениях рН, когда молекула никотина не имеет заряда. При физиологических значениях рН никотин протонирован [8].

Как известно, стимуляция экстрактом сигаретного дыма приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и вызывает множество изменений в экспрессии генов. Повышенная экспрессия молекул адгезии способствует адгезии моноцитов к эндотелию, что играет ключевую роль в дальнейшем развитии атеросклеротических бляшек, риске развития сердечно-сосудистых заболеваний [9].

В наших предыдущих работах было показано, что после воздействия раствора сигаретного дыма (РСД) на слизистую оболочку полости рта у лиц без обструктивной патологии происходит угнетение мукозального иммунитета, выражающееся в снижении уровня ферментов врождённого иммунитета (лизоцима), гуморальных факторов, связанных с нейтрофильным воспалением: интерлейкина (ИЛ)-8, лейкотриена В<sub>4</sub>, нейтрофильной эластазы, увеличении ИЛ-13 – медиатора связанного Т2 воспалением, в конечном счёте некоторые из этих изменений приводят к вероятности развития ХОБЛ [10].

В настоящее время отсутствует стандартизированный подход к получению водных экстрактов сигаретного дыма. РСД получается из самых разных тестовых продуктов с использованием различных курительных машин, как имеющихся в продаже, так и самодельных. Сложность также добавляют различные режимы затяжек, количество затяжек, тип и объём улавливающего растворителя [11]. Кроме того, в многочисленных исследованиях получение водного экстракта сигаретного дыма недостаточно подтверждается химической характеристикой полученного раствора, а некоторые исследования не делятся какими-либо такими данными (например, количественное определение никотина в аэрозолях как электронных сигарет, так и изделий для нагревания табака).

Отсутствие стандартизированного подхода создаёт большую проблему для воспроизводимости и сравнения данных токсикологической оценки электронных сигарет, изделий для нагревания табака, а также водных экстрактов сигаретного дыма, поступающих из разных лабораторий [1].

Наиболее распространённым и доступным методом определения никотина является газовая хроматография с пламенно-ионизационным детектором. При анализе сложных смесей, таких, например, как сигаретный дым, способность пламенно-ионизационного детектора регистрировать пики приобретает важное значение [12].

**Целью** настоящего исследования явилось определение концентрации никотина методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором для стандартизации водного РСД.

### Материалы и методы

Исследование проводили на базе химико-фармацевтической лаборатории учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», аккредитованной на соответствие требованиям ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 (ISO/IEC 17025:2017, IDT).

### Сущность метода

Для исследования РСД (ГОСТ ISO 3308 – 2015) растворяли в экстракционном растворе, содержащем внутренний стандарт. Содержание никотина в аликвотном растворе дыма определяли методом газовой хроматографии и вычисляли содержание никотина в РСД.

### Реактивы

Все реактивы были аналитической чистоты. В качестве аналитического стандарта использовали (-) – никотин,  $\geq 99\%$  (ГХ), фирмы Sigma-Aldrich, США, который хранили в тёмном месте при температуре от  $0^\circ\text{C}$  до  $4^\circ\text{C}$ . В качестве внутреннего стандарта использовали гексадекан,  $99,15\%$  (г/г)  $\pm 0,3\%$  (г/г), фирмы Dr. Ehrenstorfer, Германия. В качестве растворителя использовали гексан Р. В качестве подвижной фазы использовался азот для хроматографии Р.

Химические реактивы соответствовали требованиям Государственной Фармакопеи Республики Беларусь, использовалась лабораторная посуда класса точности А/AS (ISO 9001:2015), соответствующая классу 1 по ГОСТ 1770-74. Реактивы, растворы стандартных образцов и испытуемые образцы выдерживались перед использованием не менее 2 часов в лабораторных условиях ( $t=20\pm 5$ ) $^\circ\text{C}$ . Чистота никотина была определена в соответствии с ГОСТ 32175.

### Образцы

Использовались сигареты торговой марки «Kent», классические стандартного размера, с содержанием никотина  $0,7$  мг/сигарета, смол  $8$  мг/сигарета, производимых British American Tobacco (ГОСТ 3935-2000).

### Приборы и аппаратура

Анализ никотина проводился на газовом хроматографе DANI Master GC (Италия), оснащённом пламенно-ионизационным детектором и устройством автоматического ввода пробы (автосамплер). Полное разделение пиков никотина и внутреннего стандарта (рис. 1) было достигнуто с использованием капиллярной колонки, имеющей

состав фазы:  $5\%$  фенил,  $95\%$  диметилполисилоксан; диаметром  $0,32$  мм, длиной  $30$  м, толщиной слоя  $1,0$  мкм (например DN-5  $0,32\text{мм}\times 30\text{м}$ ,  $0,1$  мкм) и следующей градиентной программой: программа температуры колонки была запущена при  $50^\circ\text{C}$  с запрограммированным повышением до  $300^\circ\text{C}$  со скоростью  $15,6^\circ\text{C}/\text{мин}$ , которая удерживалась в течение  $2$  минут. В качестве газа-носителя использовался азот для хроматографии Р (чистота  $>99,95\%$ ) при расходе  $20$  мл/мин. Температура инжектора поддерживалась на уровне  $250^\circ\text{C}$ . Все инъекции выполнялись в режиме разделения потока. Температура детектора составляла  $320^\circ\text{C}$ . Горение пламени детектора поддерживалось соотношением потоков газов: азота –  $30$  мл/мин, водорода –  $40$  мл/мин, воздуха –  $400$  мл/мин.

### Генерация и сбор сигаретного дыма

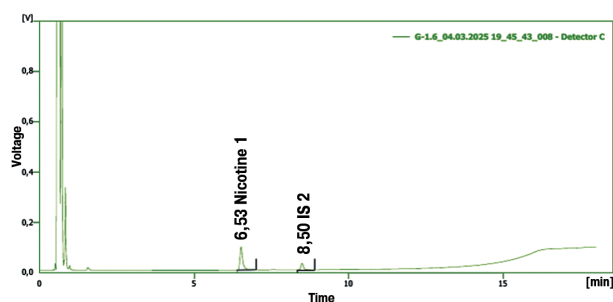
Все тестовые сигареты кондиционировались и курились в условиях окружающей среды, указанных в межгосударственном стандарте ГОСТ ИСО 3402–2003/ГОСТ Р ИСО 3402–2002 «Табак и табачные изделия – Атмосферы для кондиционирования и испытаний» (2020), а именно при температуре  $22\pm 1^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $60\pm 3\%$  и курились при температуре  $22\pm 2^\circ\text{C}$  и относительной влажности  $60\pm 5\%$ .

Сигареты курили с помощью устройства для получения РСД [13]. В соответствии со стандартной процедурой курения ГОСТ ISO 3308 – 2015 (объём затяжки  $35$  мл, продолжительность затяжки  $2$  секунды и частота затяжки  $60$  секунд). Сигареты курили до длины внешней обертки фильтра плюс  $3$  мм.

Исследование образцов РСД проводилось в два разных периода времени с интервалом  $2$  месяца. Тестовые образцы РСД анализировались в течение  $24$  часов с момента получения.

### Подготовка образца для анализа

Приготовление исходного раствора стандартного образца никотина: навеску  $20$  мг стандартного образца никотина помещали в мерную колбу



**Рис. 1. Типовая хроматограмма испытуемого образца**

Примечание. Time - время в минутах, V - высота пика, 1 - никотин, 2 - внутренний стандарт (гексадекан).

5,0 мл, растворяли в 2 мл гексана Р, доводили до соответствующего объёма колбы этим же растворителем и тщательно перемешивали.

Приготовление градуировочных растворов стандартного образца никотина: исходный раствор образца никотина растворяли в гексане Р и 0,3 мл раствора внутреннего стандарта для получения не менее пяти градуировочных растворов.

Приготовление раствора внутреннего стандарта: навеску 20 мг стандартного образца гексадекана помещали в мерную колбу 25,0 мл, растворяли в 10 мл гексана Р, доводили до соответствующего объёма колбы этим же растворителем и тщательно перемешивали.

Приготовление испытуемого образца РСД: к 1,0 мл образца РСД пипеткой-дозатором добавляли 0,05 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 1,0 мл гексана Р, перемешивали в течение 5 минут. После окончания перемешивания образец оставляли в покое для расслоения фаз. 0,7 мл верхнего (гексанового) слоя переносили с помощью пипетки-дозатора в виалу для газовой хроматографии, затем прибавляли 0,3 мл раствора внутреннего стандарта, перемешивали.

#### Процедура хроматографии

Холостые растворы, градуировочные растворы и растворы испытуемого образца РСД вводили в газовый хроматограф по 1 мкл, получая не менее одной хроматограммы для каждого раствора.

#### Обработка данных

По окончании анализа регистрировали данные и проводили расчёт количественного содержания никотина в испытуемом образце РСД с помощью линейного уравнения регрессии. Результат количественного содержания никотина в РСД выражали в мг/мл.

#### Результаты и обсуждение

При количественной оценке концентрации никотина в образцах РСД было установлено, что используемая методика специфична, линейна в диапазоне от 0,04 мг/мл до 2 мг/мл, с установленным коэффициентом корреляции не менее 0,998 ( $r=0,999$ ) и уравнением линейной регрессии  $y=2,466x-0,0649$  (рис. 2).

Количественная оценка полученных данных показала, что содержание никотина в испытуемых образцах РСД составило от 0,029 до 0,031 мг/мл при анализе каждого из двух испытуемых растворов (табл. 1).

На рисунке 1 представлена типовая хроматограмма градуировочного раствора в концентрации 1,6 мг/мл. Время удерживания пика никотина составляло 6,5 минут, время удерживания пика

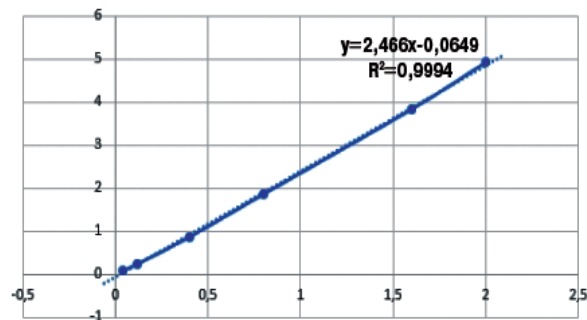


Рис. 2. График линейной зависимости никотина

Таблица 1. Количественное содержание никотина в испытуемых образцах раствора сигаретного дыма, мг/мл

Число испытаний, n	Испытуемый образец РСД №1	Испытуемый образец РСД №2
1	0,028	0,029
2	0,029	0,029
3	0,030	0,031
4	0,030	0,030
5	0,031	0,029
6	0,029	0,031
7	0,030	0,030
8	0,029	0,030
9	0,031	0,031
10	0,029	0,029

Примечание: РСД – раствор сигаретного дыма.

внутреннего стандарта – 8,5 минут. Идентификация пиков проводилась по времени удерживания.

Сигаретный дым – это сложная смесь, содержащая тысячи химических веществ. Точные химические компоненты РСД неизвестны, ясно лишь, что всё водорастворимое содержимое сигаретного дыма – твёрдые частицы и газовая фаза – растворяются в водном растворе. В растворе присутствуют специфические для табака нитрозамины, алкалоиды, аммиак, оксид углерода, хлорированные диоксины и фураны, а также большой набор производных пиридина, включая никотин. Стандартизирование таких растворов по концентрации никотина является удобным способом унификации и позволяет моделировать воздействие сигаретного дыма в эксперименте.

По результатам проведенного нами исследования сделаны следующие **выводы**:

- разработан метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором для количественного определения никотина в растворе сигаретного дыма;



- проведена стандартизация водного раствора сигаретного дыма по никотину методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором;
  - установлена концентрация никотина в водном растворе сигаретного дыма, которая составила от 0,029 до 0,031 мг/мл.
- метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором подходит и применяется для анализа образцов водного раствора сигаретного дыма, благодаря чему становится возможным использовать раствор сигаретного дыма в научно-исследовательских и диагностических целях.

## Литература

1. Bozhilova S., Baxter A., Bishop E., et al. Optimization of aqueous aerosol extract (AqE) generation from e-cigarettes and tobacco heating products for in vitro cytotoxicity testing. *Toxicol. Lett.* 2020;335:51-63.
2. Zimmer J, Bridgewater J, Ferreira F, et al. The History, Present and Future of Allergen Standardization in the United States and Europe. *Front Immunol.* 2021 Sep 14;12:725831.
3. Chang C.M., Edwards S.H., Arab A., et al. Biomarkers of Tobacco Exposure: Summary of an FDA-Sponsored Public Workshop. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2017;26:291-302.
4. Yildiz D. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 2004;43:619-632.
5. Husgafvel-Pursiainen K. Biomarkers in the assessment of exposure and the biological effects of environmental tobacco smoke. *Scand. J. Work. Environ. Health.* 2002;28(Suppl. 2):21-29.
6. Andersson C, Wennström P, Gry J. Nicotine alkaloids in Solanaceous food plants. Copenhagen: Nordic Council of Ministers. 2003.
7. Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz N.L. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol. Rev.* 2005;57:79-115.
8. Li L, Wen J, Deng Y, et al. Direct Extraction and Determination of Free Nicotine in Cigarette Smoke. *J Anal Methods Chem.* 2024 May 4;2024:9273705.
9. Giebe S, Hofmann A, Bruh M, Lowe F, Breheny D, Morawietz H, Brunssen C. Comparative study of the effects of cigarette smoke versus next generation tobacco and nicotine product extracts on endothelial function. *Redox Biol.* 2021 Nov;47:102150.
10. Гордиевич Т.Г., Ищенко О.В. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2024;4:70-83.
11. Muthumalage T, Noel A, Thanavala Y. Challenges in current inhalable tobacco toxicity assessment models: A narrative review. *Tob Induc Dis.* 2024 Jun 10;22
12. Aslani S, Armstrong DW. High information spectroscopic detection techniques for gas chromatography. *J Chromatogr A.* 2022 Aug 2;1676:463255
13. Новиков Д.К., Ищенко О.В., Гордиевич Т.Г., и др. Устройство для получения водного раствора сигаретного дыма полез. модель: пат. BY 11866 от 30.12.2018.

## Сведения об авторах

Ищенко Оксана Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». ORCID: 0000-0001-8755-7482.

Хаитов Муса Рахимович – академик РАН, д-р мед. наук, проф., директор ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России; зав. кафедрой иммунологии МБФ, ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Российская Федерация. E-mail: mr.khaitov@nrcii.ru. ORCID: 0000-0003-4961-9640.

Гордиевич Татьяна Геннадьевна – ассистент кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». 210009, Витебск, пр. Фрунзе, д. 27. e-mail: tatyana.gordievich@gmail.com. ORCID: 0009-0007-1772-0839.

Шилловский Игорь Петрович – д-р биол. наук, зам. директора по науке и инновациям ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация. E-mail: ip.shilovskiy@nrcii.ru. ORCID: 0000-0001-5343-4230.

Гончарова Татьяна Николаевна – заведующий химико-фармацевтической лабораторией УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». E-mail: lab-general@cpl.of.by.

Яцко Марина Викторовна – специалист химико-фармацевтической лаборатории УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». E-mail: lab-general@cpl.of.by.

Поступила 14.01.2025.