Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení vybraných alkaloidů s využitím separačních technik

Tereza Šalomounová

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Tereza Šalomounová**
Osobní číslo:	**C14453**
Studijní program:	**B2830 Farmakochemie a medicinální materiály**
Studijní obor:	**Farmakochemie a medicinální materiály**
Název tématu:	**Stanovení vybraných alkaloidů s využitím separačních technik**
Zadávající katedra:	**Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na účinky vybraných alkaloidů na organismus. Dále se zaměřte na využití moderních separačních technik pro jejich analýzu.

2. Porovnejte jednotlivé extrakční postupy a chromatografické metody prezentované v literatuře.

3. Výsledky kriticky zhodnoťte.

4. Sepište závěrečnou zprávu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2017**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Tereza Šalomounová

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat Doc. Ing. Lence Češlové, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a za čas strávený s vypracováním bakalářské práce.

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřena na tři vybrané alkaloidy řadící se mezi psychostimulanty, a to na nikotin, kofein a kokain. U jednotlivých alkaloidů jsou zmíněny jejich obecné fyzikálně-chemické vlastnosti, výskyt, absorpce a distribuce v organismu a jejich mechanismus účinku. Dále je pozornost zaměřena na účinky, kterými vybrané alkaloidy působí na různé části lidského organismu. Další část bakalářské práce je věnována extrakčním technikám a separačním metodám, s nimiž lze vybrané alkaloidy stanovit.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nikotin, kofein, kokain, extrakce, separační metody

TITLE

Determination of selected alcaloids using separation techniques.

ANNOTATION

This Bachelor thesis is focused on three selected alcaloids, which belong to psychostimulants, namely nicotine, caffeine and cocaine. General physicochemical properties, occurrence, absorption and distribution in the organism and their mechanism of action are mentioned for individual alcaloids. Further, the attention is paid on the effects of selected alcaloids on different parts of the human organism. Next part of the thesis deals with extraction techniques and separation methods used for alcaloids analysis.

KEYWORDS

Nicotine, caffeine, cocaine, extraction, separation methods

Obsah

Obsah 7
Seznam obrázků 9
Seznam tabulek 10
Seznam použitých zkratek 11
1 Úvod 12
2 Definice alkaloidů 13
3 Rozdělení alkaloidů 14
3.1 Klasifikace podle biosyntetické struktury 14
3.1.1 Pravé alkaloidy 14
3.1.2 Protoalkaloidy 14
3.1.3 Pseudoalkaloidy 14
4 Historický význam alkaloidů 17
5 Nikotin 18
5.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 18
5.2 Enantiomerní formy nikotinu 18
5.3 Výskyt nikotinu 19
5.4 Absorpce nikotinu 19
5.5 Distribuce nikotinu 19
5.6 Mechanismus účinku 20
5.7 Účinky nikotinu na lidský organismus 20
5.7.1 Kardiovaskulární účinky 20
5.7.2 Karcinogenní účinky 21
5.7.3 Účinky na gastrointestinální trakt 21
5.7.4 Účinek na oxidativní stres 22
5.7.5 Psychostimulační účinky 22
5.7.6 Antioxidační účinky 22
5.8 Separační metody pro stanovení nikotinu 23
6 Kofein 29
6.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 29
6.2 Výskyt kofeinu 29
6.3 Absorpce a distribuce kofeinu 30
6.4 Mechanismus účinku 30
6.5 Účinky kofeinu na lidský organismus 30
6.5.1 Kardiovaskulární účinky 30

6.5.2 Účinek na Diabetes mellitus 2. typu 31
6.5.3 Účinek na játra 32
6.5.4 Účinek na spánek 32
6.5.5 Psychotropní účinky 32
6.5.6 Účinky na neurodegenerativní onemocnění 33
6.6 Separační metody pro stanovení kofeinu 34
7 Kokain 39
7.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 39
7.2 Výskyt kokainu 39
7.3 Absorpce a distribuce kokainu 40
7.4 Mechanismus účinku 40
7.5 Účinky kokainu na lidský organismus 41
7.5.1 Kardiovaskulární účinky 41
7.5.2 Účinek na ústní a nosní dutinu 41
7.5.3 Účinky na dýchací cesty 42
7.5.4 Účinky na gastrointestinální trakt 42
7.5.5 Účinky na průběh těhotenství a vývoj plodu 42
7.5.6 Psychostimulační účinky 42
7.6 Separační metody pro stanovení kokainu 43
8 Závěr 47
9 Seznam literatury 48

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura Nikotinu.....18
Obrázek 2: Koncentrace nikotinu ve vzorcích tabáku.....24
Obrázek 3: Struktura kofeinu.....29
Obrázek 4: Struktura kokainu.....39

Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení alkaloidů 15
Tabulka 2: Koncentrace nikotinu v cigaretách 25
Tabulka 3: Obsah nikotinu ve vlasech 26
Tabulka 4: Koncentrace nikotinu v plazmě stanovená metodou UHPLC 28
Tabulka 5: Koncentrace nikotinu v plazmě stanovená metodou HPLC 28
Tabulka 6: Obsah kofeinu ve vybraných nápojích 34
Tabulka 7: Koncentrace kofeinu v nápojích 35
Tabulka 8: Koncentrace kofeinu v nápojích 36
Tabulka 9: Koncentrace kofeinu v energetických nápojích 37
Tabulka 10: Koncentrace kofeinu v nápojích 37
Tabulka 11: Koncentrace kokainu ve vlasech 45
Tabulka 12: Koncentrace kokainu v moči 46

Seznam použitých zkratek

GC	Plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GLC	Chromatografie plyn-kapalina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
UV	Ultrafialové záření
UV/Vis	Ultrafialové/viditelné záření
RSD	Relativní standardní odchylka
CE	Kapilární elektroforéza
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
CHES	(N-cyklohexylamino)ethansulfonová kyselina
SDS	Dodecylsíran sodný

1 Úvod

Alkaloidy jsou známy a využívány již dlouhou řadu let. V dávných dobách byl primární účel jejich využití v podobě obranných prostředků v boji proti predátorům nebo také jako léčivé přípravky zmírňující bolesti. Alkaloidy mohou být rostlinné, živočišné, mořské nebo se mohou vyskytovat v houbách. Alkaloidů je velký počet, nejvíce z nich však spadá do skupiny rostlinných alkaloidů. Jejich účinek může mít jak pozitivní, tak i negativní dopad na zdraví lidského organismu, kdy je míra účinku velmi závislá na dávce podávané látky. Tato bakalářská práce je zaměřena na tři vybrané alkaloidy, a to na nikotin, kofein a kokain. Tyto alkaloidy patří mezi návykové látky a mohou proto být velmi snadno zneužívány pro své stimulační účinky. V některých případech mohou být naopak jejich stimulační účinky v lékařství využívány k léčbě a zmírnění příznaků neurodegenerativních onemocnění. Vybrané alkaloidy mohou být snadno stanoveny řadou separačních metod. Nejčastěji využívanými separačními metodami u nikotinu jsou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. U kofeinu a kokainu se s oblibou hojně využívá kromě zmíněných metod i kapilární elektroforéza. Vybrané alkaloidy mohou být stanoveny z velkého počtu různých matric a jelikož je proces extrakce na typu matrice vzorku závislý, bývá u jednotlivých stanovení odlišný. Často je však využívána extrakce v systému kapalina-kapalina a mikroextrakce tuhou fází.

2 Definice alkaloidů

Termín alkaloid byl poprvé zmíněn v roce 1819 W. Meiβnerem, lékárníkem z Halle. Všiml si, že se tyto sloučeniny jeví „jako alkalické“ a tak je pojmenoval alkaloidy [1].

Z biologického hlediska je alkaloid jakákoliv biologicky aktivní heterocyklická sloučenina, která obsahuje dusík, může být farmakologicky aktivní a může mít léčivé nebo ekologické využití. Winsterstein a Tier zdůraznili základní vlastnosti alkaloidů, mezi něž patří větší či menší toxicita, která působí primárně na centrální nervový systém, základní charakter chemické konstrukce, heterocyklický dusík jako základní složka, syntéza z aminokyselin a jejich derivátů a omezená distribuce v přírodě. V jiné definici Wallerand Nowachi uvedl, že mají v molekule obsažen atom dusíku a jsou spojeny alespoň dvěma atomy uhlíku, dále že je v jejich molekule obsažen kruh, který nemusí být nutně heterocyklický [1].

Alkaloidy jsou aktivní v různých buněčných úrovních organismu a účastní se biologických procesů rostlin, zvířat a mikroorganismů žijících v různých prostředích. Z hlediska medicíny je jimi jakákoliv skupina dusíkatých látek s často složitou strukturou a vysokou molekulovou hmotností. Mají intenzivní fyziologické působení a v lékařských oborech jsou široce používány jako léčebné drogy. Některé alkaloidy mohou být vysoce toxické, a to pouze v malých dávkách. Bez alkaloidů by nebyly možné úspěchy v boji proti malárii, leukémii, rakovině a Parkinsonově chorobě. Farmaceutickému průmyslu se podařilo využívat přírodní alkaloidy pro vývoj antimalarik (např. chinin), protirakovinných látek (např. taxol) a činidel podporujících prokrvení mozku (např. vintamin) [1].

Z čistě chemického hlediska jsou alkaloidy biogenní, dusík obsahující N-heterocyklické sloučeniny [1]. Fyzikálně jsou to většinou bezbarvé, krystalické pevné látky, mírně rozpustné v neutrálním nebo alkalickém vodném roztoku, ale dobře rozpustné v kyselinách nebo organických rozpouštědlech, jako je ether, chloroform nebo ethanol. Několik alkaloidů (např. nikotin, coniin) je při pokojové teplotě kapalných, některé alkaloidy (např. berberin, sanguinarin) jsou barevné. Mnoho patří mezi opticky aktivní látky a skutečnost, že se jen zřídka vyskytují jako racemické směsi je považována za důkaz, že jsou syntetizovány alespoň částečně enzymatickou katalýzou. V některých případech se oba enantiomery přirozeně vyskytují, ale každý z jiného zdroje. Vzhledem k jejich polární povaze se většina rozpustí v částech rostlin ve formě kationtů a po odpaření mízy tvoří soli s organickými kyselinami, které jsou také přítomny [2].

3 Rozdělení alkaloidů

Alkaloidy mohou být rozděleny v závislosti na jejich biologické a ekologické aktivitě ve spojitosti s chemickou a technologickou inovací, chemickou strukturou a biosyntetickými dráhami. Z hlediska biologické aktivity je možné alkaloidy rozdělit na neutrální nebo slabě bazické molekuly, živočišné alkaloidy, mořské alkaloidy, alkaloidy vyskytující se v mechových porostech, v houbách, bakteriální alkaloidy a nepřirozené alkaloidy (strukturně modifikované nebo analogy). Na základě vztahu k inovacím v oblasti chemie a technologie je lze rozdělit do tří skupin, a to na přírodní alkaloidy, biomimické a bionické alkaloidy a syntetické alkaloidy. Podle jejich čistě chemické struktury směřující na alkaloidový základ lze alkaloidy rozdělit na akridinové, aromatické, imidazoly, indoly, piperidiny, puriny, pyrolidiny, terpenoidy a další [1].

3.1 Klasifikace podle biosyntetické struktury

Alkaloidy jsou obvykle klasifikovány podle jejich společných molekulárních prekurzorů na základě biologické dráhy použité pro vytvoření molekuly. Z konstrukčního hlediska jsou alkaloidy rozděleny podle tvaru, struktury a prekurzorů. Existují tři hlavní typy alkaloidů, a to pravé alkaloidy, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy (tabulka 1) [1].

3.1.1 Pravé alkaloidy

Pravé alkaloidy pochází z aminokyselin a sdílí heterocyklický kruh s dusíkem. Jsou to vysoce reaktivní látky, biologicky aktivní i v nízkých dávkách. Všechny mají hořkou chuť a jsou to bílé pevné látky, kromě nikotinu, který je hnědá kapalina. Ve vodě tvoří rozpustné soli a většina z nich se spojuje s kyselinami za vzniku solí. V rostlinách se mohou vyskytovat jako volné soli nebo jako N-oxidy. Primárními prekurzory pravých alkaloidů jsou aminokyseliny jako je L-ornithin, L-lysin, L-fenylalanin, L-tyrosin, L-tryptofan, L-histidin (tabulka 1) [1].

3.1.2 Protoalkaloidy

Protoalkaloidy jsou sloučeniny, ve kterých atom dusíku odvozený od aminokyseliny není součástí heterocyklického kruhu. Zahrnují sloučeniny odvozené od L-tyrosinu a L-tryptofanu (tabulka 1) [1].

3.1.3 Pseudoalkaloidy

Pseudoalkaloidy jsou sloučeniny, ve kterých základní uhlíkový skelet není odvozen od aminokyselin, jsou však spojeny s dráhami aminokyselin. Jsou odvozeny od prekurzorů a

postkurzorů aminokyselin. Mohou také pocházet z aminačních nebo transaminačních reakcí různých drah spojených s prekurzory nebo postkurzory aminokyselin (tabulka 1) [1].

Tabulka 1: Rozdělení alkaloidů [1]

Typ alkaloidu	**Prekurzor**	**Chemická skupina alkaloidů**	**Základní sloučenina**	**Příklady**
Pravé alkaloidy	L-ornithin	Pyrolidinové	Pyrolidin	Hygrin Kuskohygrin
		Tropanové	Tropan	Atropin Kokain Skopolamin Hyoscyamin
		Pyrolizidinové	Pyrolizidin	Acetyl-Lykopsamin
				Acetyl-Intermedin
				Europin
				Metheloidin
	L-lysin	Piperidinové	Piperidin	Anaferin Lobelanin Piperin Lobelin Piperidin
		Chinolizidinové	Chinolizidin	Cytisin Lupanin
		Indolizidinové	Indolizidin	Castanospermin Swantosin
	L-tyrosin	Fenylethylaminové	Fenylethylamin	Adrenalin Dopamin Noradrenalin Tyramin
		Tetrahydroiso-chinolinové	Tetrahydroisochinolin	Kodein Morfin Papaverin Tubokurarin
	L-tryptofan	Indolové	Indol	Psilocin Serotonin Tryptamin Arundacin
		Chinolinové	Chinolin	Chlorquinin Cinchonidin Chinin
		Pyroloindolové	Indol	Chimoanthen Coryanthen
		Ergotové		Ergobin Ergosin Ergostin
	L-histidin	Imidazolové	Imidazol	Histamin

				Pilokarpin
	L-arginin	Marinové	B-Carbolin	Saxitoxin Tetrodotoxin
	Antranilová kyselina	Chinolinové Akridinové	Chinolin Akridin	Bucharin Acetylfolidin Perfamin Akronycin
	Nikotinová kyselina	Pyridinové	Pyridin/Pyrolidin	Anabasin Nikotin Evolin Cassinin
Proto-alkaloidy	L-tyrosin	Fenylethylaminové	Fenylethylamin	Hordenin Mezkalin
	L-tryptofan	Terpenoindolové	Indol	Yohimbin
	L-ornithin	Pyrolizidinové	Pyrolizidin	Stachydrin
Pseudo-alkaloidy	Acetát	Piperidinové	Piperidin	Koniin Pinidin
		Seskviterpenové	Seskviterpen	Cassinin Evonin Evorin
	Pyrohroznová kyselina	Efedrinové	Fenyl	Efedrin Norefedrin
	Ferulová kyselina	Aromatické	Fenyl	Capsaicin
	Geraniol	Terpenoidové	Terpenoid	Akonitin Aktinidin Atisin
	Saponiny	Steroidní		Cholestan Cyklopamin Pregnenolon
	Adenin/Guanin	Purinové	Purin	Kofein Theobromin Theakrin

4 Historický význam alkaloidů

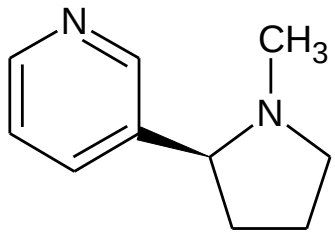
Poznatky o alkaloidech sahají do počátků civilizace, kde je lidé využívali jako léčiva, prostředky zmírňující bolesti, lektvary, léčivé čaje, obklady a jedy. Při shánění potravy a styku s nepřáteli nebyl primární účel použití alkaloidů ve formě léčivých přípravků, ale na otrávené šípy. S šípy, které jsou otrávené rostlinami obsahujícími alkaloidy, se v dnešní době stále můžeme setkat v Africe a Jižní Americe [3, 4]. Alkaloidy vyskytující se v rostlinách a tělech živočichů také sloužily jako obrana před predátory [4].

Terapeuticky účinné látky používané v medicíně byly izolovány na počátku 19. století. První prozkoumané surové léčivo bylo opium izolované z máku setého, které bylo po staletí využíváno pro své analgetické a narkotické účinky [3]. V letech 1800 až 1950 byla zavedena analytická a izolační technologie [4]. V roce 1803 Derosne izoloval poločistý alkaloid a v roce 1805 Sertürner izoloval a charakterizoval tuto složku jako morfin a objevil její základní charakter. Mezi lety 1817 až 1820 bylo izolováno mnoho účinných látek ze surových léčiv. Do skupiny alkaloidů, které byly získány v tomto období, patří strychnin, emetin, brucin, piperin, kofein, chinin, cinchonin a kolchicin. Právě tato skupina alkaloidů je považována za základní kámen všech dosud známých alkaloidů. V roce 1939 bylo izolováno a strukturně identifikováno asi dvě stě alkaloidů [3].

5 Nikotin

5.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Nikotin (obrázek 1) je chemicky 3-[(2S)-1-Methyl-2-pyrrolidinyl]pyridin s molekulovým vzorcem $C_{10}H_{14}N_2$ [5].



Obrázek 1: Struktura Nikotinu [5]

Čistý nikotin je bezbarvá kapalina s charakteristicky nepříjemným zápachem. Působením vzduchu nebo světla či ponecháním ve tmě v uzavřené lahvi se bezbarvá nebo světle žlutá olejovitá kapalina změní na hnědou kapalinu, jejíž toxicita zůstává stejná. Bod varu nikotinu je 246-247°C [6]. Nikotin je vysoce rozpustný v rozpouštědlech jako je voda, methanol, acetonitril a chloroform [7]. Může být snadno extrahován z vodných roztoků extrakcí rozpouštědlem [8]. Molekula nikotinu obsahuje asymetrický uhlík, a proto se vyskytuje ve dvou enantiomerních formách [9]. Díky obsahu pyrolidinového a pyridinového dusíku je při 15 °C dibazický. Při pH 7,4 a teplotě 37 °C je asi 69 % pyrolidinového dusíku ionizováno, zatímco pyridinový dusík zůstává neionizován. Nikotin při pH 7,4 existuje v obou formách, neionizovaná forma proniká lipoproteinovou membránou, ionizovaná forma membránou neproniká [6]. Jakmile je nikotin při průchodu biologickými membránami, včetně hematoencefalické membrány, absorbován, je metabolizován v játrech na řadu hlavních a vedlejších metabolitů [8].

5.2 Enantiomerní formy nikotinu

Enantiomery nikotinu se vyznačují rozdílným působením. Bylo zjištěno, že u zvířat se jeví (-)-nikotin přibližně dvakrát více toxický než (+)-nikotin. Podávání (-)-nikotinu vyvolává křeče, (+)-nikotin způsobuje cukání kůže. Ve studii zaměřené na srovnání účinnosti obou enantiomerů bylo zjištěno, že u zvířat je (-)-nikotin více efektivní na zvyšování krevního tlaku. Oba dva stereoizomery mají protibolestivé účinky, avšak u (-)-nikotinu jsou tyto účinky silnější. (-)-nikotin je také účinnější ve vyvolání oxidativního stresu v porovnání s (+)-nikotinem [8].

5.3 Výskyt nikotinu

Nikotin se přirozeně vyskytuje v rostlině tabáku, s vysokou koncentrací v tabákových listech. Představuje 0,3-5 % sušiny z rostliny. Jeho biosyntéza probíhá v kořenech a následně se hromadí v listech rostliny tabáku. Kromě rostliny tabáku se v menším množství nachází i v jiných rostlinách řádu Lilkotvaré *(Solanales)*, a to v rajčatech, bramborách, lilku a v zelené paprice. Nikotin se také nachází v rostlině Koka [9]. Během sklizně a fermentace může být nikotin převeden na řadu biologicky významných látek, z nichž nejvýznamnější jsou specifické tabákové nitrosaminy [8].

5.4 Absorpce nikotinu

Nikotin může být absorbován prostřednictvím ústní dutiny, kůže, plic, močového měchýře a zažívacího traktu. Rychlost absorpce nikotinu přes biologické membrány je závislá na pH. Podíl neionizovaného nikotinu se zvyšuje, když se pH roztoku obsahujícího nikotin zvyšuje. Podíl ionizovaného nikotinu je naopak zvyšován při snižujícím se pH. Rychlost absorpce nikotinu přes biologické membrány se tedy zvyšuje, když se pH vodného roztoku zvyšuje. Absorpce nikotinu přes ústní sliznici je hlavní cesta absorpce u kuřáků, kteří kouř nevdechují. Hodnota pH cigaretového tabáku je asi 5,5. Při této hodnotě pH je nikotin téměř celý ionizován. Sliznicí dutiny ústní je tedy absorbován pouze v malé míře. Hlavní cesta absorpce u kuřáků, kteří kouř vdechují, je přes plicní sklípky. Hodnota frakce cigaretového kouře je okolo 8,5 a pH plicních sklípků 7,4. Při této hodnotě pH je asi 31 % nikotinu neionizováno a snadno prochází buněčnou membránou do oběhu. Extrahovaný nikotin může být reabsorbován prostřednictvím močového měchýře pouze v případě, kdy je pH moči vyšší než 6 [8]. Žaludkem je nikotin absorbován špatně v důsledku kyselosti žaludeční šťávy, ale je dobře absorbován v tenkém střevě, které má více alkalické pH a velký povrch [10].

5.5 Distribuce nikotinu

Po absorpci nikotin vstupuje do krevního oběhu, kde je při pH 7,4 69 % ionizováno a 31 % neionizováno. Vazba na plazmatické bílkoviny je nižší než 5 %. Nikotin je distribuován do tělesných tkání, přičemž jeho nejvyšší afinita je k játrům, ledvinám, slezině, plicím, nejnižší afinita je k tukové tkáni. Na mozkovou tkáň se nikotin váže s vysokou afinitou a vazebná kapacita receptoru je vyšší u kuřáků v porovnání s nekuřáky. Důvodem vyšší vazebné schopnosti je vyšší počet nikotinových cholinergních receptorů v mozku kuřáků. Nikotin se také hromadí v žaludeční šťávě a slinách. Tato akumulace je způsobena iontovým zachycením

nikotinu. Nikotin se hromadí i v mateřském mléce [11]. Nikotin volně prochází placentou, tudíž plod matky, která kouří, je vystaven vyšší koncentraci nikotinu než matka [10].

5.6 Mechanismus účinku

Základem farmakologického účinku nikotinu je jeho působení na nikotinové acetylcholinergní receptory [12]. Tyto receptory jsou jedním z hlavních podtypů receptorů acetylcholinu. Jakmile jsou nikotinové receptory stimulovány uvolňují acetylcholin, noradrenalin, dopamin, serotonin, vasopresin, růstový hormon a adrenokortikotropní hormon [13]. Nikotin stimuluje nikotin acetylcholinergní receptory a po navázání molekuly nikotinu na receptor zůstává receptor depolarizován po delší dobu než u acetylcholinu. Nikotin se tedy vyznačuje dvojím účinem. První účinek spočívá ve stimulaci receptoru, což je agonická funkce, druhý účinek spočívá v následné blokaci receptoru, což je antagonická funkce. Blokace receptoru je významnější efekt v porovnání se stimulací, protože mozek se blokaci přizpůsobí a překonává ji, zatímco u stimulace dochází ke zvýšení počtu nikotinových receptorů. U lidí kouřících cigarety častěji v kratších intervalech dochází ke zvyšování počtu nikotinových receptorů a zastavení příjmu nikotinu následně vede k abstinenčním příznakům [12].

5.7 Účinky nikotinu na lidský organismus

5.7.1 Kardiovaskulární účinky

Kouření cigaret je jednou z hlavních příčin vzniku předčasných kardiovaskulárních onemocnění. Výrazně zvyšuje riziko vzniku akutních koronárních a cerebrovaskulárních příhod, včetně infarktu myokardu a mrtvice. Urychluje aterogenezi a tím následný vznik aterosklerózy v epikardiálních věnčitých tepnách, aortě, krkavici a mozkových tepnách [14].

Cigaretový kouř obsahuje více než 9000 chemických látek a více než 69 známých karcinogenů. Mezi složky, které způsobují kardiovaskulární onemocnění, patří oxidující chemické sloučeniny, oxid uhelnatý, těkavé organické látky, částice, těžké kovy a nikotin [14].

Nikotin podporuje vznik aterosklerotického onemocnění působením na metabolismus lipidů. Kuřáci mají zvýšené nízkodenzitní lipoproteiny a oproti tomu snížené vysokodenzitní lipoproteiny, což zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy. Také peroxidace lipidů a generování volných radikálů jsou procesy spojené s patogenezí aterosklerózy [10]. Za příčinu kardiovaskulárních onemocnění je považována vaskulární endoteliální dysfunkce, která je pevně spojena s patogenezí různých chronických poruch, jako je ateroskleróza, hypertenze, srdeční selhání, diabetes mellitus a mrtvice [15].

Kouření cigaret způsobuje zvýšení adrenalinu v plasmě, což má za následek zvýšení srdeční frekvence, kontraktilitu myokardu a krevního tlaku [14]. Nikotin je spojen s řadou rytmických poruch, mezi které patří fibrilace síní, ventrikulární extrasystoly, tachykardie, komorové fibrilace a supraventrikulární arytmie [15].

5.7.2 Karcinogenní účinky

Nikotin zvyšuje riziko vzniku rakoviny stimulací buněčného růstu, potlačením apoptózy a indukcí angiogeneze v nádorech [9]. Vazba nikotinu a jeho metabolitů na nikotinové acetylcholinergní receptory stimuluje signální dráhy a reakce, které jsou zodpovědné za zvýšení buněčné proliferace a přežívání buněk. Uvolněním adrenalinu a noradrenalinu, což je děj zprostředkovaný nikotinem, dojde k jejich navázání na β-adrenergní receptory a následné aktivaci. Důsledkem je stimulace více onkogenních a mitogenních signálních kaskád, aktivace proliferativních cest, uvolnění epidermálního růstového faktoru, vaskulárního endoteliálního faktoru a arachidonové kyseliny. Díky nikotinu buňka snáze získává migrační vlastnost a usnadní se vznik rakovinných metastáz [16].

Kromě samotného nikotinu vykazují karcinogenní účinky i kotinin, což je tkáňový metabolit nikotinu, a dva tabákové nitrosaminy odvozené od nikotinu, N´-nitrosonornikotin a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon, a to při vazbě na acetylcholinergní receptory nonneuroálních buněk [17].

5.7.3 Účinky na gastrointestinální trakt

Chronické podávání nikotinu, alespoň 25 mg/kg po dobu 10 dní, zvyšuje vylučování žaludeční šťávy, což je jednou z hlavních příčin agresivní tvorby vředů. Během hodiny po podání nikotinu dochází ke snížení pH, což znamená, že nikotin může mít vliv na postprandiální žaludeční neutralizaci [18].

Nikotin stimuluje sekreci pepsinogenu prostřednictvím nikotinových receptorů v žaludečních buňkách za současného zvýšení volných vápníkových iontů v cytosolu. Pepsin je považován za agresivní činidlo v patogenezi vředu. Nikotin ve formě nikotinových žvýkaček vyvolává uvolňování vasopresinu. Uvolněný vasopresin způsobuje vazokonstrikci, agregaci krevních destiček, endogenní vasopresin se podílí na vývoji gastroduodenálních vředů. Nikotin také potlačuje regeneraci sliznice prostřednictvím inhibice ornithin dekarboxylázy a snížením exprese iontového draselného kanálu. V některých případech, například při spotřebě ethanolu, může nikotin žaludeční sliznici chránit. Ethanol způsobí úbytek slizničního hlenu a

intragastrické podání nikotinu zamezuje poškození sliznice prostřednictvím zvýšené produkce hlenu [18].

5.7.4 Účinek na oxidativní stres

Účinkem nikotinu dochází ke snížení činnosti enzymů likvidujících volné radikály, superoxid dismutázy, katalázy a glutathion reduktázy. Následkem snížené tvorby těchto enzymů dochází ke zvýšené tvorbě superoxidového aniontu a peroxidu vodíku, který následně vede ke tvorbě volných hydroxylových radikálů. Hydroxylové volné radikály se účastní mnoha toxických reakcích. Zvýšená produkce superoxidového aniontu a peroxidu vodíku může způsobit poškození alveolárních makrofágů a uvolnění protolytických enzymů. Produkty peroxidace lipidů, jež se po podání nikotinu zvyšují, mohou způsobit nevratné poškození membránové struktury buněk. Nikotin také indukuje tvorbu volných radikálů a způsobuje peroxidaci lipidů v pankreatické tkáni a sliznici jícnu [8].

5.7.5 Psychostimulační účinky

Nikotin je silný ganglionický a centrálně nervový stimulant. Váže se na nikotinové cholinergní receptory, které se nachází v mozku, autonomních gangliích, nadledvinách a neuromuskulárních spojeních. Nikotin působí jak sympaticky, tak parasympaticky, ale hlavním účinkem je sympatická nervová stimulace, a to jak centrální, tak periferní. Současně dochází k uvolnění katecholaminů z nadledvin a z centrálních nervových zakončení. Následkem je zvýšené uvolňování neurotransmiterů, mezi které patří adrenalin, noradrenalin, dopamin, acetylcholin, serotonin, vasopresin, glutamát, oxid dusnatý a β-endorphin. Vysoká návykovost nikotinu spočívá v jeho dopaminergních vlastnostech [19].

Nikotin zlepšuje kognitivní funkce, jež zahrnují schopnost učení, paměť a pozornost. Tyto účinky bývají využívány ke zmírnění příznaků neurodegenerativních onemocnění, například při léčbě Alzheimerovy nemoci [19].

5.7.6 Antioxidační účinky

Nikotin vykazuje antioxidační účinky v souvislosti s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou. Váže se na železnaté ionty a redukuje transferinem zprostředkované vychytávání železa, které se podílí na vývoji Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby produkcí oxidativního stresu prostřednictvím přeměny peroxidu vodíku na hydroxylový radikál [20].

Nikotin příznivě působí proti Parkinsonově chorobě. Způsobuje aktivaci dopaminergního systému a chrání proti glutamátem zprostředkované neurotoxicitě v

mozkových neuronech. Nikotin potlačuje tvorbu toxinu pomocí enzymů, mezi které patří například monoaminové oxidázy. Aktivací drah, které kontrolují uvolňování neurotransmiterů, může dojít k inhibici toxinem vyvolané apoptózy a zvýšené produkci neurotrofních faktorů nezbytných pro neuronální údržbu, přežití a regeneraci [21].

Proti Alzheimerově chorobě nikotin působí prostřednictvím α7 nikotinových acetylcholinergních receptorů nebo pomocí bez receptorových drah. U transgenní myši nikotin snížil akumulaci β amyloidu v mozkové kůře a hipokampu amyloidního prekurzorového proteinu prostřednictvím α7 nikotinových acetylcholinergních receptorů [21].

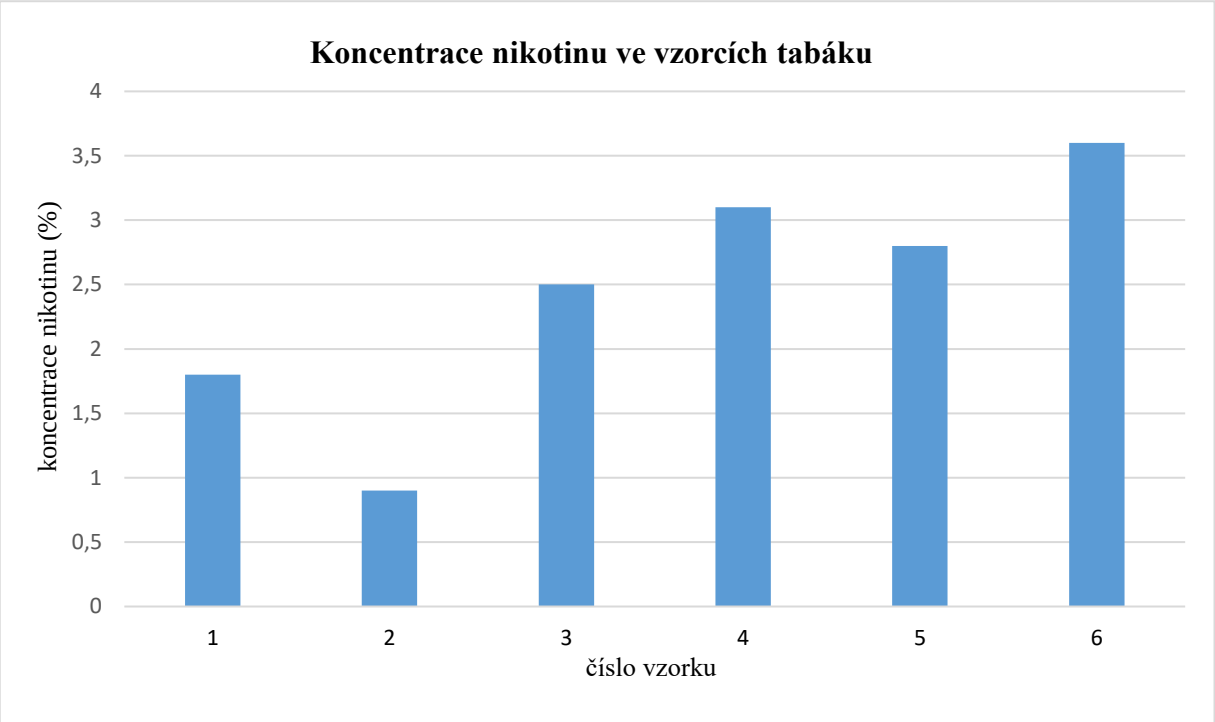
5.8 Separační metody pro stanovení nikotinu

Nejčastěji využívanými separačními metodami, které slouží ke stanovení nikotinu, jsou plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [22-30], chromatografie plyn-kapalina (GLC) [31], vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [32-36] a ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC) [37, 38].

Plynová chromatografie je separační metoda, při které dochází k selektivnímu rozdělení složek směsi mezi mobilní a stacionární fází. K procesu dělení dochází v důsledku opakované sorpce/desorpce při pohybu analytu stacionární fází, a také díky různým distribučním koeficientům jednotlivých složek směsi. Vzorek je zaváděn do horní části kolony a nosný plyn s analytem se pohybuje kolonou různou rychlostí a jednotlivé složky eluují dále do detektoru. Po převedení signálu detektoru je zaznamenán chromatogram s píky analytů [39]. Pro stanovení nikotinu bývá nejčastěji použita kapilární chromatografická kolona [23, 26-28] a k detekci je nejčastěji použit plamenově-ionizační detektor [23, 24] nebo hmotnostní spektrometr s elektronovou ionizací [22, 26-28]. Jako analyzátor je nejčastěji použit kvadrupól [25]. Mobilní fází může být helium [22, 23, 25-29] nebo vodík [24]. Nikotin se nejčastěji stanovuje v tabákových listech [29-31], tabákových výrobcích [22-24], ve vlasech [25, 28], moči [25, 27, 32-35, 38] a plazmě [26, 33, 36, 37].

Pro stanovení nikotinu v tabákových listech může být použita separační metoda GC-MS [29, 30] a GLC [31]. Listy je nutné usušit a následně rozdrtit na prášek. Vzorek může být extrahován methanolem [29], kdy je pak následně injekčně vstříknut do přístroje a analyzován. Další možnost extrakce vzorku spočívá v použití hydroxidu sodného a následně dichlormethanu [30] jako extrakčního činidla. Analýza je provedena za použití helia [29, 30] jako nosného plynu. Identifikace látek obsažených v extraktu byla provedena na základě porovnání

retenčních časů a hmotnostních spekter sledovaných látek se standardy. U výsledků analýzy nikotinu popsané Hossainem [29] (obrázek 2), nabýval limit detekce hodnoty 2,5 ng [29]. U druhé metody, popsané Shenem [30], byly analyzovány pouze 4 vzorky a stanovené koncentrace nikotinu nabývaly hodnot 2,16 %, 2,9 %, 2,42 % a 2,16 %, s limitem detekce 7,1 μg^{-1} a standardní relativní odchylkou 2,77-9,97 % [30]. U první metody se obsah nikotinu v listech tabáků liší prokazatelně více než u metody druhé, což mohlo být způsobeno použitím vzorků listů z různých regionů, kde může být odlišné chemické složení ovlivněno půdou, úrodností a věkem rostliny [29].



Obrázek 2: Koncentrace nikotinu ve vzorcích tabáku [29]

Za použití chromatografické metody plyn-kapalina byl vzorek podroben ultrazvukové extrakci. Do usušeného vzorku tabákových listů byl přidán vnitřní standard a dále methanol alkalizovaný hydroxidem draselným. Pro stanovení byl použit jak dusíkofosforový detektor, tak plamenově-ionizační detektor. Přestože při použití dusíkofosforového detektoru byly získány „čistčí“ chromatogramy, jeho nestabilita a závislost na experimentálních podmínkách ho řadí do pozadí a upřednostňuje se použití plamenově-ionizačního detektoru. Výsledky stanovení jsou závislé na polaritě použitých chromatografických kolon. Lze říci, že s použitím polárních kolon bylo dosaženo méně přesných výsledků, a to nejvíce za použití kolony CP-Wax-51 GB, u níž koncentrace nikotinu dosahovala hodnoty 9,09 mg/g s relativní standardní odchylkou 0,06 [31].

Nejznámějším komerčním zdrojem nikotinu jsou cigarety, z nichž můžeme nikotin opět stanovit metodou GC-MS [23, 22]. Jedna z metod přípravy vzorku zahrnuje vykouření vzorků cigaret kuřáckým strojem, shromáždění kondenzátu cigaretového dýmu na filtrovací podložce, odstranění neutrální frakce extrakcí dichlormethanem, upravení pH vodného roztoku hydroxidem sodným, extrakce nikotinu dichlormethanem a vysušení síranem sodným [23]. Druhá možnost přípravy zahrnuje rozemletí tabákového plniva z cigaret na jemný prášek, ponechání 24 hodin ve vlhké komoře a pro extrakci vrchní plochy nad vzorkem použití polydimethylsiloxanového vlákna pro mikroextrakci tuhou fází. Může být také použito Carbowax/divinylbenzenové vlákno, které se vyznačuje výbornou schopností pro detekci nikotinu, ale za použití polydimethylsiloxanového vlákna však byla reprodukovatelnost vzorku daleko lepší a byly také poskytnuty konzistentnější výsledky [22]. Třetí možností je extrakce vzorku pomocí etheru a hydroxidu sodného [24]. Pro stanovení se jako nosný plyn zpravidla používá helium [22, 23] nebo vodík [24]. K detekci se opět nejčastěji využívá hmotnostní spektrometr [22] nebo plamenově-ionizační detektor [23, 24]. Jelikož tabáková matrice obsahuje velké množství sloučenin, bývá upřednostněna headspace analýza, oproti injekčnímu vstřikování kapaliny nebo ponoření vlákna do roztoku vzorku. Separace alkaloidů od ostatních sloučenin je uskutečněna za použití kapilární kolony [22].

Tabulka 2: Koncentrace nikotinu v cigaretách [23]

Druh cigaret	Distribuce nikotinu %	RSD %
Tuopai	98,04	2
Zhongnanhai	97,75	
Marlboro	97,64	

Obsah nikotinu v tabákovém plniči přítomném v komerčních cigaretách se typicky pohybuje v rozmezí od 1 do 3 % na celkovou hmotnost tabáku v závislosti na složení směsi použité ve výrobní praxi [22]. Metoda popsaná Caiem [24] s extrakcí vzorku pomocí etheru a hydroxidu sodného, uvedla hodnotu distribuce nikotinu na 98,9 % s relativní standardní odchylkou v rozmezí 1,5-10,3 % [24]. Metoda extrakce dichlormethanem (tabulka 2) a metoda extrakce etherem a hydroxidem sodným poskytly téměř srovnatelné výsledky. Mírné odchylky mohou být způsobeny tím, že různé druhy komerčních cigaret obsahují různé množství nikotinu. Za použití polydimethylsiloxanového vlákna se obsah nikotinu v testovaných

cigaretách pohyboval v rozmezí 8,1-22,1 mg/g. Opět byly zaznamenány rozdíly v závislosti na testované značce cigaret [22].

Stanovení nikotinu z vlasů je opět prováděno metodou GC-MS [25, 28]. Vzorek vlasů je smíchán s hydroxidem sodným a difenylaminem a extrahován směsí rozpouštědel methanol: chloroform (1:3) [28]. Jako extrakční činidlo je také možné použít dichlormethan, s předchozím přídavkem hydroxidu sodného a chloridu sodného [25]. K vysušení extraktu se zpravidla používá bezvodý síran sodný [28]. Nosným plynem je helium [25, 28] a k detekci slouží hmotnostní spektrometr s kvadrupólem jako analyzátorem [25]. Pomocí extrakce směsí methanol: chloroform byla u nekuřáků zjištěná hladina nikotinu desetkrát nižší (2,58±3,49 ng/mg) než u aktivních kuřáků, u nekuřáků dlouhodobě nevystavených tabákovému kouři třikrát nižší než u pasivních kuřáků (tabulka 3) [28].

Tabulka 3: Obsah nikotinu ve vlasech [28]

	N	**%**	**Obsah nikotinu (průměr + standardní odchylka) ng/mg**
Nekuřáci nevystaveni tabákovému kouři	16	15,2	1,02 ± 1,36
Pasivní kuřáci	70	66,7	2,94 ± 0,45
Bývalí kuřáci	2	1,9	4,59 ± 0,15
Aktivní kuřáci	17	16,2	26,25 ± 24,56

U extrakce dichlormethanem bylo dosaženo podobných, i když ne srovnatelných výsledků, kdy u kuřáků byla koncentrace nikotinu ve vlasech naměřena na 29 ng/mg a u nekuřáků na 0,15 ng/mg [25]. Analýza vlasů poskytuje testování dlouhodobé expozice, kdy vzorky vlasů mohou sloužit pro potvrzení užívání tabáku po delší dobu s použitím mezních hodnot, které jsou 2-5 ng/mg a indikují příjem tabákového kouře [25].

Mezi další hojně využívané metody pro stanovení nikotinu patří HPLC [32-36] a UHPLC [36, 37]. HPLC je fyzikální separační technika prováděná v kapalné fázi, v níž je vzorek rozdělen na jednotlivé složky distribucí mezi mobilní fází, kterou je proudící kapalina, a stacionární fází, což je sorbent naplněný v koloně [40]. Jestliže je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní, jedná se o systém s normálními fázemi. Pokud je naopak mobilní fáze polárnější než fáze stacionární, jedná se o systém s obrácenými fázemi. Mobilní fáze odtékající z kolony, která obsahuje oddělené rozpuštěné látky, je dále snímána detektorem [41], což bývá

u HPLC nejčastěji spektrofotometrický detektor [32, 34, 36, 38]. Často používanými mobilními fázemi jsou směs acetonitrilu a fosfátového pufru [38], směs citrátového a dibazického fosfátu [32], směs hydrogenfosforečnanu draselného, methanolu a trimethylaminu [33], směs methanolu, hydrogenfosforečnanu sodného a kyseliny fosforečné [36]. Kapalinovou chromatografií můžeme stanovit obsah nikotinu v moči. Vzorek moči je nutné nejprve alkalizovat hydroxidem sodným nebo hydroxidem draselným, jelikož při kyselém pH nemůžeme nikotin stanovit [35], a jako extrakční činidlo může sloužit dichlormethan [32], směs undekanolu a trichlormethanu [35] nebo chloroformu a propan-2-olu [38]. Extrakci je možné provést i za pomocí dutého vlákna a [bmim]PF_6 jako extrakčního činidla [33]. Za použití kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla stanovena koncentrace nikotinu v moči na 11-19,750 ng/ml s relativní standardní odchylkou 1,8-4,1 % [38]. S použitím metody HPLC a extrakce pomocí dutého vlákna bylo dosaženo hodnot 0-1,78 µg/ml s relativní standardní odchylkou 1,7 %, což je přesnější výsledek [33]. Tato metoda má velkou stabilitu pro analýzu biologických vzorků, jelikož použití jednorázových vláken může snížit vliv matrice. Relativní výtěžky se pohybovaly okolo 91,1-99,4 %, což potvrzuje, že je extrakční proces ovlivněn malou vzorkovou matricí [33].

Z plasmy může být nikotin stanoven pomocí UHPLC, HPLC nebo GC-MS. Vzorky je nutné nejprve alkalizovat pomocí hydroxidu sodného [36] hydrogenuhličitanu sodného [37] nebo uhličitanu draselného [26]. Jako extrakční činidlo je použit dichlormethan [36, 37] nebo ethylether [22]. K organické frakci je potom přidána kyselina chlorovodíková [36] nebo kyselina octová [22]. Vzorek je následně usušen pomocí síranu sodného [22]. Vzorek může být také podroben mikroextrakci v kapalné fázi za přítomnosti dutého vlákna s použitím [bmim]PF_6 jako extrakčního činidla [33]. Detekce se zpravidla provádí pomocí spektrofotometrického detektoru [36] nebo pomocí hmotnostního spektrometru [37].

Tabulka 4: Koncentrace nikotinu v plazmě stanovená metodou UHPLC [37]

		Měření ob den		Měření během dne	
	Teoretická koncentrace (ng/ml)	**Naměřená koncentrace (ng/ml)**	**Přesnost (%)**	**Naměřená koncentrace (ng/ml)**	**Přesnost (%)**
Nikotin	30	29,7	10,0	29,8	9,1
	400	430	13,5	411,1	8,7
	800	824,4	14,0	808,1	4,6

Tabulka 5: Koncentrace nikotinu v plazmě stanovená metodou HPLC [36]

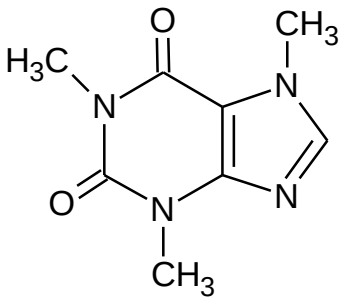
Měření ob den				Měření během dne			
Teoretická konc. (ng/ml)	**Naměřená konc. (ng/ml)**	**RSD %**	**Přesnost %**	**Teoretická konc. (ng/ml)**	**Naměřená konc. (ng/ml)**	**RSD %**	**Přesnost %**
0,2	0,18	5,9	89,9	0,2	0,20	17,0	99,4
0,5	0,52	15,9	103,5	0,5	0,47	14,6	94,2
1	0,96	9,7	95,9	1	1,01	5,9	100,6
2	1,96	3,7	97,9	2	2,02	8,2	100,9
5	4,7	8,3	99,3	5	4,96	6,9	99,3
10	10,00	4,8	100	10	10,00	2,3	100,0
25	24,92	6,9	99,7	25	24,80	0,8	99,2

HPLC ve spojení se spektrofotometrickým detektorem se vyznačuje lepšími a přesnějšími výsledky (tabulka 5), ve srovnání s UHPLC (tabulka 4) které jsou konzistentní a spolehlivé. Mobilní fáze byla modifikována tak, aby byly poskytnuty vyšší píky nikotinu. Těkavost nikotinu při odpařování byla zabráněna přídavkem koncentrované HCl do organického rozpouštědla, za vzniku nikotinu jako hydrochloridové soli [36]. Za použití metody GC-MS byl dosáhnut limit detekce nikotinu v plazmě 1 ng/ml. Koncentrace nikotinu v testovaných vzorcích se pohybovala v rozmezí 6-498 ng/ml. Jednostupňová extrakce poskytla poměrně vysoké výtěžky s malými odchylkami, a to konkrétně 90,5 ± 3,7 (4,1%) a 88,1±3,6 (4,1%) [22]. Limit detekce v metodě popsané Linem dosáhl hodnoty 0,05 μg/ml. Koncentrace nikotinu v plazmě byla v rozmezí 0,02-0,69 μg/ml. Jak už bylo popsáno dříve, použití jednorázových vláken může snížit vliv matrice vzorku. Relativní výtěžky se pohybovaly v rozmezí 91,1-99,4 %, což potvrzuje, že je extrakční proces ovlivněn malou vzorkovou matricí [33].

6 Kofein

6.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kofein (obrázek 3) je chemicky 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl-1H-purin-2,6-dion s molekulovým vzorcem $C_8H_{10}N_4O_2$ [42].



Obrázek 3: Struktura kofeinu [42]

Kofein je alkaloid, který patří do skupiny methylxanthinů. V čistém stavu je to bílý prášek nebo tvoří jemné bílé lesklé jehličky. Kofein je látka s intenzivně hořkou chutí, bez zápachu. Taje při teplotě 236 °C, k sublimaci dochází při teplotě 178 °C atmosférického tlaku [43]. Kofein je dobře rozpustný ve vroucí vodě, chloroformu, pyrrolu, tetrahydrofuranu a ethylacetátu. Rozpustnost ve vodě je zvýšena alkalickými benzoáty, cinnamáty, citráty nebo salicyláty [42]. Ve velké míře je metabolizován v játrech za vzniku tří hlavních metabolitů, a to 3,7-dimethylxanthinu, 1,7-dimethylxanthinu a 1,3-dimethylxanthinu [44].

6.2 Výskyt kofeinu

Kofein je přirozeně se vyskytující alkaloid a nachází se v různém množství ve fazolích, listech a plodech až 60 druhů rostlin. Mezi nejběžnější zdroje patří ořech kolovníku zašpičatělého (*Cola acuminata*), kakaový bob (*Theobroma cacao*), yerba maté (*Ilex paraguariensis*) a plody guarany (*Paullinia curpana*). Zdrojem stravovacího kofeinu je pražená zrnková káva (Kávovník arabský a Kávovník statný) a čajové lístky (*Camelia simiensis*). Kofein je také obsažen v různých nealkoholických a energetických nápojích, čokoládě, ale i v některých lécích proti bolesti a v potravinových doplňcích [44].

6.3 Absorpce a distribuce kofeinu

Po orálním užití je kofein z 99 % absorbován z gastrointestinálního traktu do krevního oběhu. Je široce distribuován v těle a díky hydrofobním vlastnostem prochází všemi biologickými membránami, včetně hematoencefalické bariéry a placentární bariéry. Mezi 15 až 20 minutami je dosaženo jeho maximální plazmatické koncentrace, což odpovídá 8-10 mg/l po dávkách 5-8 mg/kg. Jeden šálek kávy poskytuje dávku kofeinu o velikosti 0,4-2,5 mg/kg a dává maximální plazmatickou koncentraci 0,25-2 mg/l. Pro dávky nižší než 10 mg/kg je poločas rozpadu 2,5-4,5 hodin. Mezi poločasem rozpadu kofeinu u starších a mladých lidí není žádný rozdíl. Naopak se v průběhu novorozeneckého období zvyšuje vzhledem k nižší aktivitě cytochromu P-450 a nevyvinutelnosti některých demethylačních a acylačních drah [45, 46].

6.4 Mechanismus účinku

Podstatou mechanismu účinku kofeinu je blokace adenosinových receptorů A_1 a A_{2a}. K blokaci dochází již při nízkých koncentracích kofeinu, získaných z jednoho šálku kávy. Kofein může také inhibovat fosfodiesterázu a mobilizovat intracelulární vápník, tohoto účinku je však dosaženo až při vysokých dávkách kofeinu, které není možné získat potravou [46]. Adenosin je přítomen ve všech buňkách s receptory distribuovanými v mozkových buňkách a jakákoliv nerovnováha v tomto systému vede k neurologickým dysfunkcím [47]. Adenosinové receptory A_1 se nachází téměř ve všech oblastech mozku, receptory A_{2a} se nachází v oblastech mozku bohatých na dopamin [46]. Adenosinové receptory A_1 a A_{2a} mají k adenosinu vysokou afinitu a jsou zodpovědné za tonické působení endogenního adenosinu. Kofein tedy může, jako adenosin, působit na všechny oblasti mozku za předpokladu, že endogenní adenosin aktivuje receptory [47]. Blokace A_{2a} receptorů ve striatopallidálních neuronech a neporušená dopaminergní neurotransmise má zásadní význam pro stimulační účinky kofeinu. Selektivní blokací adenosinových receptorů A_{2a} mohou být napodobeny účinky vyvolané nízkou dávkou kofeinu [46].

6.5 Účinky kofeinu na lidský organismus

6.5.1 Kardiovaskulární účinky

Kofein vyvolává různé akutní účinky na kardiovaskulární systém, zahrnující působení na krevní tlak, cirkulaci katecholaminů, tuhost tepen a vazodilataci. Kromě kofeinu patří mezi biologicky aktivní složky kávy kyselina chlorogenová, diterpenové alkoholy kafestol a kahweol, které mohou také vykazovat účinky na kardiovaskulární systém působením na krevní tlak a plazmatickou koncentraci cholesterolu a homocysteinu. Pravidelná konzumace kávy vede

ke zvýšené koncentraci homocysteinu, která je rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárních onemocnění [48].

Po vypití dvou šálků kávy (150 ml s obsahem kofeinu 120 mg) dochází k akutnímu zvýšení systolického a diastolického krevního tlaku a mírnému snížení tepové frekvence. Jelikož stimulací adenosinových receptorů dochází k vazodilataci v cévních lůžkách, kofein může vyvolávat vazokonstrikci. Akutní podávání kofeinu zvyšuje systémovou vaskulární rezistenci a také cirkulující koncentraci adrenalinu a v menší míře noradrenalinu. Pití kávy nepříznivě ovlivňuje tuhost tepen snížením elasticity cévní stěny, a vazodilataci a akutně zvyšuje rychlost aortálních pulsních vln a odrazivost, což vede k riziku výskytu ischemické choroby srdeční [48]. Příjem nefiltrované kávy významně přispívá ke zvýšení hladiny celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů. Nefiltrovaná káva je bohatá na diterpenové alkoholy kahweol a kafestol, které jsou příčinou vzrůstu hladiny cholesterolu. Vysoké dávky kofeinu mohou zvýšit frekvenci ventrikulární arytmie, což je vyvoláno katecholaminy [49].

6.5.2 Účinek na Diabetes mellitus 2. typu

Kofein obsažený v kávě se spolu s dalšími složkami, mezi které patří karbohydráty, lipidy, vitaminy, dusíkaté sloučeniny a mikroživiny [50], podílí na prevenci vzniku diabetes mellitus 2. typu. Naopak příjmem kofeinových „soft“ nápojů se riziko vzniku onemocnění zvyšuje, a to díky obsahu pouze kofeinu bez ostatních složek a díky obsahu velkého množství cukru [51].

Káva vykazuje hypoglykemické účinky a její zvýšená konzumace snižuje plazmatickou koncentraci glukózy. Její vyšší dlouhodobá spotřeba tedy snižuje riziko vzniku diabetes mellitus 2. typu, jelikož pomáhá udržet optimální toleranci glukózy a zvyšuje citlivost na inzulin. Diabetes mellitus 2. typu je ovlivněn aktivací zánětlivých cytokinů a chemokinů, tudíž potlačením těchto markerů vhodným protizánětlivým činidlem dochází k zastavení zánětlivého procesu. Konzumace kávy významně snižuje hladiny protizánětlivých markerů, jako je interleukin, C-reaktivní protein a monocytární chemotaktický protein. Kofein stimuluje sekreci inzulinu z beta-buněk pankreatických ostrůvků inhibicí antagonistických účinků cAMP fosfodiesterázy na sekreci izulinu. Působí také jako agonista ryanodinových receptorů v pankreatických beta-buňkách, které kontrolují regulaci vápníku, a stimuluje uvolnění Ca^{2+}, což v přítomnosti glukózy vyvolává sekreci inzulinu. Akutní podávání kofeinu snižuje metabolismus glukózy a citlivost na inzulin, což je způsobeno zvýšením plazmatické

koncentrace adrenalinu. Fenolické látky obsažené v kávě působí proti negativním účinkům kofeinu na metabolismus glukózy zvýšením citlivosti na inzulin v periferních tkáních, snížením inzulinové rezistence a inhibicí vstřebávání glukózy ve střevě [50].

6.5.3 Účinek na játra

Konzumací kávy dochází ke snížení koncentrace jaterních enzymů alaninaminotransferázy, aspartátaminotransferázy a γ-glutamyltransferázy. Spotřeba kofeinu snižuje riziko zvýšené koncentrace aminotransferáz, kde míra snížení je závislá na dávce kofeinu. Pravidelný příjem kávy je spojen se sníženou mírou progrese onemocnění jater u pacientů s chronickou hepatitidou C, má příznivé účinky na závažnost jaterní fibrózy, snižuje oxidativní poškození DNA, zvyšuje apoptózu, vede k prodloužení telomer, stabilizaci DNA a snižuje ukládání prokolagenu III. U pacientů s nealkoholickou steatózou, kteří pijí kávu, bylo zaznamenáno menší zapojení tuku v játrech. U pacientů s nealkoholickou steatohepatitidou snížil zvýšený příjem kávy riziko pokročilé fibrózy, a to díky mechanismu, kterým je káva schopna snížit rychlost ukládání tuku a kolagenu v játrech. Konzumace kávy je také spojena se sníženým rizikem vzniku hepatocelulárního karcinomu až o 40 %. Kofein působí na jaterní enzymy a ovlivňuje rozvoj cirhózy, čímž chrání proti jaterní karcinogenezi. K ochraně před hepatokarcinogenitou přispívají i kafestol a kahweol [52].

6.5.4 Účinek na spánek

Adenosin inhibuje cholinergní neurony, které jsou zodpovědné za povzbuzení a vzrušení organismu, a tak ovlivňuje rovnováhu spánku, jeho vývoj a průběh. Kofein, jako adenosinový antagonista, ruší spánek vyvolaný adenosinem. Bylo zjištěno, že podání 77-322 mg kofeinu osobě, která váží 70 kg, 30 minut před spánkem způsobí snížení celkové doby spánku, snížení procent 3-4 fází spánku v závislosti na dávce a zvýšení latence ke spánku. K narušení REM spánku nedochází. Po podání kofeinu byla také zaznamenána pomalá aktivita vln na EEG během spánku. Denní příjem kofeinu přispívá k nekvalitnímu spánku, tyto poruchy vedou k ospalosti a opětovné spotřebě kofeinu, která opět vede k denní spavosti. U lidí s nejzávažnější ospalostí, která trvá alespoň jeden měsíc a více, byla zaznamenána vysoká denní spotřeba kofeinu odpovídající 7 a více šálků čaje nebo kávy denně. Takto vysoký příjem kofeinu je spojen se zvýšenou bdělostí v průběhu spánku a se zkrácenou dobou spaní [53].

6.5.5 Psychotropní účinky

Kofein zvyšuje dráždivost sympatického nervového systému citlivého na adenosin. Signály, které ze sympatického nervového systému pochází, přechodně zvyšují koncentraci

cyklického adenosinmonofosfátu uvnitř postsynaptické buňky, přes kterou je signál zprostředkován. Kofein, jako antagonista adenosinu, inhibuje enzymatické odbourávání cyklického adenosin monofosfátu fosfodiesterázami v postsynaptické buňce a zvyšuje sílu přenášených signálů [54].

Kofein zvyšuje odpočinkový energetický výdej zvýšením aktivity sympatiku a stimulace tukové lipolýzy. Způsobuje také zvýšení koncentrace serotoninu v mozkových oblastech s excitačními výběžky míšních motorických neuronů. Příjem kofeinu zvyšuje průtok krve mozkovými tepnami a akutně zvyšuje účinnost neuronových sítí v mozkové kůře. Tím dochází ke zvýšení pozornosti a schopnosti soustředění. Umírněná konzumace kofeinu také pozitivně přispívá ke zvýšené nervosvalové koordinaci [54].

Při vysokých dávkách může kofein u slabých jedinců vyvolat příznaky „kofeinismu“. Mezi jeho typické příznaky patří úzkost, neklid, nervozita, dysforie, nespavost, psychomotorický neklid, nesourodý tok myšlení a řeči a náladovost. Pokud dojde k odnětí kofeinu, mohou se objevit bolesti hlavy, únava, ospalost, úzkost a deprese, které mají nejsilnější průběh mezi 1-2 dnem po ukončení příjmu a trvají po dobu jednoho týdne. V dávkách vyšších jak 300 mg je považován za induktor úzkosti. Na vzniku úzkosti má však kromě dávkování vliv i přítomnost úzkostných poruch a genetická predispozice. Naopak příjem kofeinu v nízkých dávkách snižuje stavy úzkosti a zlepšuje náladu [55].

6.5.6 Účinky na neurodegenerativní onemocnění

Ve studii na zvířecím modelu, myši, bylo prokázáno, že podání kofeinu snižuje koncentraci beta-amyloidu v oblastech mozku a také dochází ke zlepšení paměti. Kofein zvyšuje aktivitu Na^+-K^+-ATPázy. Jeho dlouhodobá spotřeba zvyšuje produkci mozkomíšního moku a zvyšuje průtok krve mozkovými tepnami. Dlouhodobá konzumace kofeinu má tedy ochranné účinky proti Azheimerově chorobě. Kofein také vykazuje ochranný účinek proti amyotropické laterální skleróze. U amyotropické laterální sklerózy je chronický zánět nervů spojen se zvýšením extracelulární hladiny glutamátu, excitačního neurotransmiteru. Kofein zamezuje účinku glutamátu na neuroálních receptorech. Konzumace kávy je také ochranným prostředkem proti Parkinsonově chorobě. Za tento účinek kávy je zodpovědná složka ekosanoyl-5-hydroxytryptamid, která významně snižuje agregaci proteinu a fosforylaci, zlepšuje celistvost neuronů a snižuje zánět nervů [56].

6.6 Separační metody pro stanovení kofeinu

Mezi separační metody, které lze využít pro stanovení kofeinu, patří plynová chromatografie (GC) [57], plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) [58-60], vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [61-66], ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [67], micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) [68-70] a kapilární elektroforéza (CE) [71, 72]. Kofein se nejčastěji stanovuje v potravinách a nápojích.

Plynovou chromatografií lze kofein stanovit za použití helia jako nosného plynu [57, 58, 60]. Používanými detektory jsou dusíkofosforový detektor [57] či hmotnostní spektrometr [58, 59, 60]. Součástí chromatografického systému je kapilární kolona [57-59, 60]. Do stanovovaných vzorků může být před extrakcí přidáván NaCl [57] a samotná extrakce je pak provedena směsí ethanolu a chloroformu [57] nebo čistého chloroformu [58, 59]. Jako extrakční činidlo může také sloužit toluen, oktan, dichlormethan [58], benzen a ethylacetát [59], avšak jako nejlepší extrakční činidlo byl vyhodnocen chloroform [58, 59].

Tabulka 6: Obsah kofeinu ve vybraných nápojích [57]

Vzorek	Obsah kofeinu [µl/ml]	Přidaný obsah kofeinu [µl/ml]	Zjištěný obsah kofeinu [µl/ml]	RSD %, n=3
Zelený čaj	120,5	50	169,8	3,7
Oolong čaj	145,2	50	193,3	4,5
Bílý čaj	165,8	50	214,1	3,9
Černý čaj	149,5	50	198,8	3,6
Čajový sáček	171,7	50	220,4	4,8
Zrnková káva	267,5	50	318,1	3,0
Káva Nescafe	246,8	50	295,6	3,8
Red bull	297,7	50	348,2	3,4
Hype	314,7	50	364,4	2,8
Coca Cola	94,1	25	118,9	4,4
Coca Cola zero	83,1	25	107,7	3,1
Pepsi	55,5	25	80,6	3,7
Pepsi max	51,3	25	76,2	2,7

7up	-	25	24,5	4,2
Sprite	-	25	24,4	4,5

Metoda popsaná Sereshtim [57] se díky velké povrchové ploše mezi extrakčním rozpouštědlem a vodnou fází vzorku vyznačuje krátkou extrakční dobou, která trvá jen několik sekund. Limit detekce byl stanoven na 0,02 μg/ml. Spotřeba organického rozpouštědla je nízká, proto se tato metoda řadí mezi metody šetrné k životnímu prostředí [57]. Pomocí této metody byl stanoven obsah kofeinu v různých typech nápojů, jako káva, čaj a nealkoholické sycené nápoje. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Podobnou studií se zabýval Zou [59], kde však nebylo dosaženo takových výsledků (tabulka 7), což mohlo být způsobeno přídavkem NaCl před extrakcí.

Tabulka 7: Koncentrace kofeinu v nápojích [59]

Vzorek	**Koncentrace kofeinu [mg/l]**	**RSD [%]**
Coca-Cola	95,7	1,03
Pepsi	105,2	0,57
Future	108,1	0,33

Metoda s uvedenými výsledky (tabulka 7) se vyznačuje delší extrakční dobou, s časem 15 minut a limitem detekce 0,004 mg/l. Deklarované hodnoty výrobcem pro uvedené výrobky jsou 95,7 mg/l pro Coca-Colu a 104,2 mg/l pro Pepsi [59], což vypovídá o velké přesnosti použité metody.

Pro stanovení kofeinu kapalinovou chromatografií mohou být použity jak monolitické kolony [63, 64], tak kolony plněné chemicky modifikovaným oktadecylsilikagelem [65-67]. Mobilními fázemi mohou být kyselina mravenčí a methanol [61], směs dihydrogenfosforečnanu draselného, acetonitrilu a methanolu [62], acetonitril a voda [63, 64], směs ethanolu, vody a kyseliny octové [65], směs methanolu, dihydrogenfosforečnanu sodného a hexansulfonové kyseliny [66] a směs acetonitrilu a kyseliny fosforečné [67]. K detekci se nejčastěji využívá spektrofotometrický [62-65, 67] nebo fluorescenční [66] detektor či hmotnostní spektrometr [61]. Extrakce vzorku může být provedena roztokem octanu olovnatého [61] nebo methanolem a chloroformem [62]. Ve většině případů byly vzorky kávy [63-65], čaje [64, 65] a kakaa [64, 65] rozemlety na jemný prášek, rozpuštěny ve vodě, zfiltrovány a přímo injekčně vstříknuty do HPLC systému [63-65]. Vzorek kakaa je možné zbavit obsahu tuku Soxhletovou extrakcí s hexanem [65].

Tabulka 8: Koncentrace kofeinu v nápojích [62]

Vzorek	Koncentrace kofeinu[mg/l]	RSD %
Coca Cola	130,5	0,93
Double Cola	162,5	0,88
Uro Cola	125	0,89
RC Cola	133	0,97
Suncrest Cola	109	0,85
Pepsi Cola	101	0,87
Zelený čaj	9,88	1,03
Černý čaj	9,80	0,98
Káva	9,93	0,97

V tabulce 8 jsou uvedeny koncentrace kofeinu stanovené v nápojích pomocí HPLC a extrakce kapalina-kapalina, s použitím methanolu a chloroformu jako extrakčního činidla. Výtěžek extrakce u vzorku černého čaje nabýval hodnoty 2,74 %, u zeleného čaje 4,88 % a u kávy 13,7 %. Jelikož je komerční káva a čaj složena z mnoha složek, které způsobují chromatografickou interferenci s kofeinem, byly vzorky dále extrahovány na tuhé fázi, což umožnilo oddělení kofeinu a odstranění většiny rušivých složek [62].

Elektroforéza je separační technika založená na migraci analytu roztokem vlivem gravitačního pole. Při elektroforetické separaci je nezbytné, aby byl analyt nabitý. Pokud je analyt začleněn do iontové micely, získá zjevnou elektroforetickou pohyblivost a pohybuje se stejnou rychlostí, jakou může být zjištěna přítomnost micel pod okolní vodnou fází [73]. MEKC, tedy micelární elektrokinetická chromatografie, je způsob kapilární elektroforézy, v kterém se používají micely jako pseudo-stacionární fáze. Přidání micel v pufrovaném roztoku, kde probíhá elektroforetický proces, umožňuje stanovení neutrálních a nabitých analytů v jedné analýze [70]. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometrického detektoru [68-72]. Při pH vyšším než 8,7 není možné kofein stanovit kapilární elektroforézou, jelikož se za těchto podmínek nerozpustí a pohybuje se spolu s elektroneutrálními látkami. V důsledku toho je vhodné využít techniku MEKC a separovat kofein v prostředí CHES/NaOH s přídavkem SDS. Hydrofóbní kofein vstupuje do anionické migrační micely a odděluje se tak

od zóny elektroneutrálních látek [68]. Jako elektrolyt také může sloužit uhličitan sodný a SDS [69].

Tabulka 9: Koncentrace kofeinu v energetických nápojích [68]

	Koncentrace kofeinu [mg/l]	**RSD %**
Redbull	324 ± 1,2	0,2
Kamikaze	459,2 ± 13,5	1,3

Deklarované hodnoty obsahu kofeinu v nápoji Redbull jsou 320 mg/l a v nápoji Kamikaze 480 mg/l. Limit detekce je poměrně vysoký, a rovný 250,4 mg/l [68]. Ve studii od Injace Radeho [70] byly získány hodnoty koncentrace kofeinu v energetickém nápoji Redbull 321,8 mg/l, v nápoji Pepsi 122,1 mg/l, v nápoji Coca Cola 105,1 mg/l, v nápoji Coca Cola Light 123,0 mg/l, v nápoji Nestea Lemon 38,8 mg/l, v kávě Nescaffe 4 g/100 g a v zeleném čaji 40,8 mg/1 šálek (1,75g). Limit detekce byl stanoven na 2 mg/l [70]. Hodnota koncentrace kofeinu v nápoji Redbull se blíží hodnotě deklarované daleko více než hodnota popsaná ve studii od Blanky Vochyánové s výsledky uvedenými v tabulce 9.

Tabulka 10: Koncentrace kofeinu v nápojích [71]

Vzorek	**Koncentrace kofeinu v originálu [mg/ml]**	**Přidaný obsah [mg/ml]**	**Stanovený obsah [mg/ml]**	**RSD %**
Coca-Cola	0,15	0,074	0,217	4,85
Čaj	0,124	0,068	0,197	1,14
Čajové lístky	34,30	25,9	60,98	2,03
Pražená káva	15,85	25,00	41,17	1,83

Ve studii Li Mengjia [71] byly získány výsledky (tabulka 10) za použití vysoce přesného systému qCE (kvantitativní kapilární elektroforézy) s přesným zavedením vzorku. Limit detekce byl stanoven na 3 μg/ml. I přesto, že stále existují problémy spojené s efektivitou separace, úspěšné dosažení kvantitativního nástřiku tímto systémem má značný příslib pro aplikace jak v řízení jakosti, tak při zajišťování kvality [71]. Výhodou kapilární elektroforézy nad vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je nízká cena, ekologická přívětivost metody a nepřítomnost asymetrických píků při analýze organických kyselin nebo bází. S řadou

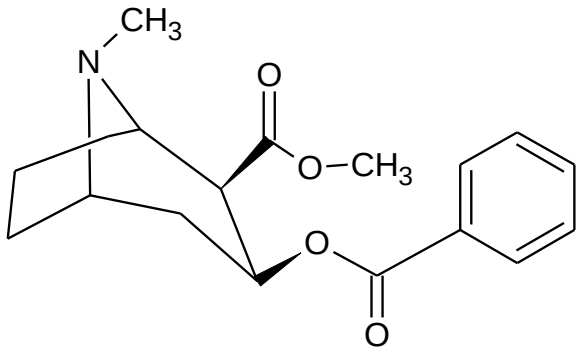
jednoduchých podmínek poskytuje CE stanovení labilních sloučenin v komplikované matrici se stanovenou přesností [72].

7 Kokain

7.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kokain (Obrázek 4) je chemicky methyl-(1R,2R,3S,5S)-3-(Benzoyloxy)-8-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]oktan-2-karboxylát s molekulovým vzorcem $C_{17}H_{21}NO_4$ [74].

s



Obrázek 4: Struktura kokainu [74]

Kokain je bezbarvá až bílá krystalická nebo práškovitá látka. Ve formě monolitických tablet taje při teplotě 98°C. Je to látka nestálá, zvláště nad 90°C. Jeden gram kokainu je rozpustný v 600 ml vody, 270 ml vody zahřáté na teplotu 80°C, 6,5 ml alkoholu, 0,7 ml chloroformu, 3,5 ml etheru a 12 ml terpentýnovém oleji. Je také rozpustný v acetonu, ethylacetátu, sirouhlíku a šetrně v minerálním oleji [74, 75]. Kokain je terciární amin, s hodnotou pKa 8,6. Při vyšších hodnotách pH převažuje neionizovaná forma kokainu nebo forma volné báze, zatímco při nižších hodnotách pH kokain existuje ve formě soli, například jako hydrochlorid. Mezi hlavní metabolity kokainu patří ekgonin methyl ester a benzoylekgonin [76].

7.2 Výskyt kokainu

Kokain se získává z listů rostliny Koka (*Erythroxylon Coca*), která obsahuje 0,6-1,8 % kokainu. Rostlina obsahuje řadu dalších alkaloidů, nejkoncentrovanějším je ale kokain. Rostlina je pěstována pro své listy, které jsou sbírány třikrát až čtyřikrát ročně a následně jsou sušeny. Z listů se kokain extrahuje organickým rozpouštědlem za vzniku pasty, která obsahuje asi 80 % kokainu. Dále se vede kyselým vodným roztokem na bázi kyseliny chlorovodíkové, poté je neutralizován a kokain extrahován rekrystalizací [77, 78].

7.3 Absorpce a distribuce kokainu

Míra absorpce kokainu je závislá na způsobu podání. Po perorálním podání se kokain objeví v krvi zhruba po 30 minutách a maximální koncentrace dosáhne po 50-90 minutách. Po orálním podání je kokain v trávícím systému ionizován a zpomaluje proces absorpce. V kyselém prostředí tedy dochází k ionizaci a je zamezen prostup kokainu do buněk, zatímco v alkalickém prostředí k ionizaci téměř nedochází a míra absorpce je zvýšena. Po nasálním podání je účinek kokainu znát do 3 minut, trvá 30-60 minut a maximální plazmatické koncentrace je dosaženo po 15 minutách. Inhalačním podáním se absorbuje 20-60 % kokainu, v závislosti na vasokonstrikčním účinku. K extrémně rychlé absorpci dochází po intravenózní aplikaci, kdy koncentrace kokainu v krvi vzroste během pár minut, a také kouřením. Kokain ve formě volné báze nepodléhá presystémové eliminaci a jeho plazmatická koncentrace je zvýšena na 1-2 mg/l. K účinku na mozek dochází velmi rychle, zhruba po 8-12 sekundách a účinek trvá 5-10 minut [75, 77]. Kokain je distribuován do všech tělesných tkání. Snadno prostupuje hematoencefalickou bariérou a ve velkých a opakovaných dávkách dochází k jeho akumulaci v centrálním nervovém systému a v tukové tkání, důsledkem rozpustnosti v lipidech. Kokain také prostupuje placentární membránou, prostou difuzí, a po opakovaném užívání se hromadí v plodu matky. Poločas rozpadu kokainu závisí na způsobu podání a dávkování. Pohybuje se mezi 0,7-1,5 hodiny, kdy u perorálního podání je 0,8 hodin, u nasálního podání 1,25 hodiny a u parenterálního podání 0,7-0,9 hodin [75].

7.4 Mechanismus účinku

Kokain zabraňuje zpětnému vychytávání dopaminu, noradrenalinu a serotoninu, čímž prodlužuje jejich aktivitu v synapsi. Neurotransmitery se hromadí a stimulují neuronální receptory. Akutním podáním kokainu je koncentrace dopaminu v mozku zvýšena, po několika minutách je opět snížena na normální hodnoty. Po opakovaném podávání způsobuje snížení koncentrace dopaminu v mozku. Působením kokainu také dochází k inhibici katecholaminů, což může zvyšovat tok vápníku a způsobit přecitlivělost receptorů, čímž mohou být ovlivněny periferní orgány. Po lokální aplikaci kokainu dochází k blokaci neuronálního přenosu, což je následkem silného lokálního anestetického účinku na úrovni smyslových nervových zakončení [75]. Další působení kokainu spočívá v inhibici sodíkových kanálů, což je příčinou řady kardiovaskulárních chorob [79].

7.5 Účinky kokainu na lidský organismus

7.5.1 Kardiovaskulární účinky

Kokain snižuje průtok krve do srdce, mění krevní obraz (urychluje aterosklerózu, zvyšuje agregaci krevních destiček a podněcuje tvorbu trombu) a zvyšuje spotřebu kyslíku. Všechny tyto zmíněné děje mohou vést k infarktu myokardu. Při užívání kokainu dochází ke snížení průměru koronárních artérií o 4-29 %. Za vasopresické účinky kokainu je zodpovědný noradrenalin, a to stimulací α-adrenergních receptorů v cévách srdce. Intranasálně podaný kokain v dávce použité pro lokální anestezii způsobuje vazokonstrikci koronárních artérií a snižuje koronární průtok krve, navzdory zvýšení srdeční frekvence a spotřebě kyslíku. Vazokonstrikce kokainem je způsobena inhibicí lokální produkce oxidu dusnatého, který je vazodilatátorem. Sympatomimetické účinky kokainu vedou ke zvýšené srdeční frekvenci, krevního tlaku a zvýšené spotřebě srdečního kyslíku. Lokální anestetické účinky kokainu jsou důsledkem inhibice přílivu sodíku v průběhu depolarizace. Kokain se odděluje od sodíkových kanálů, oddaluje navrácení vzrušivosti a poškozuje vodivost vzruchu. Z tohoto důvodu je považován za činidlo způsobující arytmii. Chronické užívání kokainu je spojeno se zvýšenou hmotností levé komory srdeční a tloušťkou stěny (hypertrofie). Kokain způsobuje apoptózu myocytů, buněk hladkého svalstva aortální cévy a endoteliálních buněk koronární arterie. Současné užívání alkoholu zvyšuje účinek na kardiovaskulární systém a riziko náhlé srdeční smrti [80].

7.5.2 Účinek na ústní a nosní dutinu

Hlavní cestou podání kokainu je „šňupání“. Při podání kokainu kouřením musí být prášek kokainu převeden do formy uzpůsobené pro kouření za použití hydrogenuhličitanu sodného. Tato forma je známá jako „crack“ kvůli prasknutí zvuku během ohřevu. Více než polovina lidí šňupajících kokain opakovaně krvácí z nosu, trpí rýmou a chronickým onemocněním vedlejších dutin dýchacích. U 5 % lidí je také pozorována perforace nosní přepážky. Vazokonstrikční účinek kokainu vyvolává lokální ischemii, která může vést k nekróze nosní přepážky a okolních tkání. Šňupání kokainu zhoršuje transport slizničního systému, který odstraňuje částice z nosu, a tím je snížena obranyschopnost proti infekci. Chronické užívání kokainu má podobné účinky na patro v dutině ústní, kdy všechny perforace zahrnují tvrdé patro. Pacienti s patální perforací trpí vážným poškozením řeči. Jejich řeč se stává hypernasální a dochází k velmi špatné artikulaci, čímž je omezena schopnost komunikace [81].

7.5.3 Účinky na dýchací cesty

Kouření kokainu vyvolává bronchokonstrikci a má vliv na závažnost akutních astmatických projevů. Po inhalaci kokainu ve formě volné báze bylo zaznamenáno křečové plicní krvácení u pacientů s akutními plicními syndromy. U pacientů se vyskytla horečka, bolest na hrudi, nedostatek kyslíku v krvi a selhání dýchání. Dále byl zaznamenán výskyt alveolárního krvácení, pneumotorax a výskyt plynu v osrdečníku. Silné opakované kouření kokainu je spojeno s významnou abnormalitou v difúzní kapacitě plic. Snížení difúzní kapacity plic vede k poškození alveolární kapilární membrány. U lidí užívajících kokain se vyskytuje anémie a alveolární krvácení. Přítomnost anémie vede k poklesu difúzní kapacity plic, zatímco alveolární krvácení difúzní kapacitu plic zvyšuje. Vazokonstrikční účinek kokainu vede k mediální hypertrofii a plicní hypertenzi [82].

7.5.4 Účinky na gastrointestinální trakt

Kouření kokainu způsobuje střevní perforaci. Jelikož kokain brání opětovnému vychytávání noradrenalinu, vede k nedokrvení střev, což způsobuje perforaci. Intravenózní podání kokainu způsobuje nedokrvení střev bez důkazu trombózy, embolie nebo ateroskleróz. Střevní vaskulatura obsahuje α-adrenergní receptory, které jsou stimulovány noradrenalinem, což vede k mezentrické vazokonstrikci a fokální ischémii. Spotřeba kokainu vede k tvorbě trombů a agregaci trombocytů, což může být způsobeno zvýšením endogenního tromboxanu B2. Užívání kokainu také způsobuje žaludeční vředy, retroperitoneální fibrózu a viscelární infarkt [82].

7.5.5 Účinky na průběh těhotenství a vývoj plodu

Těžké užívání kokainu způsobuje ablaci placenty, abnormální průběh porodu, spontánní potrat, předčasné prasknutí membrán a prasknutí dělohy. Zvýšené hladiny katecholaminů mohou způsobit anorexii a negativně ovlivnit výživu. Děti narozené matkám užívajících kokain mají vyšší pravděpodobnost nízké porodní hmotnosti, zvýšené riziko náhlého úmrtí dětí, nekrotilizující enterokolitidy, cévní mozkové příhody, vrozených abnormalit a poruch chování. Jelikož kokain způsobuje vazokonstrikci, snižuje tak průtok krve dělohou, což následně vede k poruchám vedení kyslíku k plodu. Díky tomu, že kokain prostupuje placentární bariérou, zvyšuje koncentraci katecholaminů v plodu a způsobuje tak retardaci intrauterinního růstu [82].

7.5.6 Psychostimulační účinky

Kokain je spolu s metamfetaminem považován za jednoho z nejnebezpečnějších a nejnávykovějších stimulantů. Toxicita kokainu je špatně korelovatelná s jeho dávkou nebo

cestou podání, avšak potenciál závislosti je důležitější, pokud je podán formou kouření nebo intravenózně. Účinky kokainu spočívají ve zvýšené energii a společenském chování, euforii, snížené únavě, potřebě spánku a chuti k jídlu. Po podání kokainu formou kouření nebo injekcí byl intenzivní příjemný pocit popsán jako „celkový orgasmus těla“. Se zvyšující se dávkou a dobou užívání roste výskyt nezáměrných nežádoucích účinků, zahrnujících dysforickou náladu, záchvaty paniky, paranoidní reakce, zhoršený úsudek a psychotické symptomy, jako jsou bludy a halucinace. Výskyt nespavosti, ztráty hmotnosti, paranoie nebo halucinací může být velmi vysoký. Kokain je často považován za afrodiziakum, ale pokud je pod jeho účinkem sexuální touha zvýšena, může dojít k narušení erekce a zpoždění nebo inhibici ejakulace. Abstinenční syndrom se skládá z únavy, snížené schopnosti cítit potěšení, úzkosti, zvýšené chuti k jídlu a zvýšené potřebě spánku. Fyzické příznaky mohou zahrnovat muskuloskeletární bolest, třes, zimnici a nedobrovolné pohyby. V počátečním období abstinenčního syndromu se často vyskytuje riziko sebevražedného myšlení. Několik týdnů po snížení užívání kokainu byly zaznamenány poruchy ovlivňující vizuálně-motorické výkony, pozornost, verbální paměť a rozhodování [19].

7.6 Separační metody pro stanovení kokainu

Pro stanovení kokainu lze využít plynovou chromatografii [83-85], plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií [85-90], vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) [91-95] a kapilární elektroforézu (CE) [96-101]. Kokain lze stanovit například v moči [83, 86, 87, 96, 98, 99], vlasech [89, 92, 95, 97, 100, 101], plazmě [91, 93, 94], nebo přímo v rostlině *Erythroxylum coca* [84, 88]. Analýza moči je stále nejúčinnějším zkušebním vzorkem pro sledování nedávné expozice drog [87].

Při stanovení pomocí plynové chromatografie se v dnešní době výhradně používá kapilární kolona [83, 84, 86-88] a jako nosného plynu se nejčastěji využívá hélia [84, 86-89], méně často dusíku [83]. K detekci analytu lze využít dusíkofosforový [83] či plamenově-ionizační [84, 85, 88] detektor, stále častěji se využívá spojení s hmotnostním spektrometrem [86-89], Lze také použít kombinaci dvou detektorů, kdy plamenoionizační detektor slouží k identifikaci analytu a hmotnostní spektrometr ke zjištění množství daného analytu [88]. Vzorky moči lze podrobit mikroextrakci tuhou fází (MEPS), kdy v prvním kroku nejprve dochází ke zředění vzorků pufrem a fosforečnanem draselným. Odstranění endogenních interferencí je dosaženo za použití čtyř cyklů s kyselinou mravenčí a provedením čtyř zdvihů vzduchu k odstranění vody. Eluce zachycených analytů ze sorbentu probíhá čtyřmi zdvihy hydroxidu amonného v methanolu s následnou derivatizací extraktu [86]. Vzorek moči také

může být podroben mikroextrakci z tuhé fáze. Do vzorku je nutné přidat směs $NaHCO_3$:K_2CO_3 k dosažení hodnoty pH 9-10, pro zabránění hydrolýzy [83, 87]. Polydimethylsiloxanové vlákno je vloženo do vzorku a dochází k sorpci analytů. Extrakce je podpořena mícháním k dosažení optimálního výměnného povrchu [87]. Vzorky je také možné extrahovat v systému kapalina-kapalina za použití směsi ethyletheru a isopropanolu jako extrakčního činidla. Do extraktu je pak přidán bezvodý síran sodný [83]. V metodě stanovení kokainu podle Rosada [86] byla v autentických vzorcích moči dosažena koncentrace 40-377 ng/ml. Výtěžek extrakce představoval 67-83,3 %. Spodní hranice kvantifikace byla stanovena na 25 ng/ml, kdy tento výsledek nebyl považován za pozitivní. Limit detekce byl taktéž stanoven na hodnotu 25 ng/ml. Metoda extrakce tuhou fází (MEPS) vede k rychlé a účinné extrakci cílových analytů s nižší spotřebou vzorků a rozpouštědel. Výhodou je opakované použití sorbentu, což vede ke snížení nákladů. Metoda byla dobře aplikovatelná pro autentické vzorky, což dokazuje její užitečnost při rutinním testováním léků [86]. V metodě podle Yonamina [87] byla stanovena koncentrace kokainu v moči na 114 ng/ml. Spodní hranice kvantifikace a limit detekce byly stanoveny na 5 ng/ml, což je mnohem lepší výsledek oproti metodě popsané Rosadem [86]. Při použití mikroextrakce je nízká spotřeba rozpouštědel a vytváří se méně zbytků [87]. Metoda provedená Farinem [83] stanovila koncentraci kokainu na 41,6 ng/ml s limitem detekce 15 ng/ml a spodní hranicí kvantifikace na 20 ng/ml. Výtěžek extrakce byl 74,4 % [83], který je srovnatelný s výtěžkem extrakce tuhou fází. Monitorování užívání drog považuje přítomnost kokainu v moči za ukazatel nedávného užívání drogy.

Listy *Erythroxylum coca* je před extrakcí nutné rozdrtit na prášek. Vzorek rozpuštěný v methanolu je pak podroben mikrovlnné extrakci [84, 88] a analyzován, nebo může být v dalším kroku následně extrahován mikroextrakcí tuhou fází pomocí polydimethysiloxanového vlákna [88]. Kombinací mikrovlnné extrakce s mikroextrakcí tuhou fází byla stanovena koncentrace kokainu 0,7±0,04 % na váhu suchého listu. Relativní standardní odchylka byla menší než 5 % a čas extrakce činil 15 minut [88]. Tento výsledek je srovnatelný s použitím pouze mikrovlnné extrakce, kdy koncentrace kokainu dosáhla hodnoty 0,680±0,004 % na váhu suchého listu. Relativní standardní odchylka se pohybovala mezi 7,8-9,3 % a čas extrakce činil 30 sekund [84].

Při stanovení kokainu kapalinovou chromatografií bývají často použity kolony plněné chemicky vázanou oktadecylsilikagelovou stacionární fází (C18) [90, 91, 95]. Mobilní fáze bývá složena z acetonitrilu a fosfátového pufru [90, 94], fosfátového pufru, acetonitrilu a methanolu [95], octanu amonného v methanolu a octanu amonného ve vodě [91], octanu amonného v acetonitrilu [92] a z trifluoracetátu v acetonitrilu, methanolu a vody [93].

K detekci analytu bývá použit spektrofotometrický [90, 94] nebo fluorimetrický [95] detektor, dále je možné využít hmotnostního spektrometru [91] většinou s trojitým kvadrupólem jako analyzátorem [92, 93].

Analýza kokainu ve vlasech vykazuje mnoho výhod ve srovnání s analýzou v moči, a to snadný a neinvazivní odběr, stabilitu matrice, snadnou dopravu a skladování [92]. Vlasy je nejprve nutné promýt methanolem [95] nebo dichlormethanem [92] a poté nasekat na menší kousky. Vzorky vlasů jsou podrobeny inkubační extrakci s kyselinou chlorovodíkovou [92, 95] a následně extrakci na tuhé fázi, kde byla náplň pro aktivaci promývána methanolem. Před extrakcí na tuhé fázi se do vzorku zpravidla přidává fosfátový pufr a hydroxid draselný. K eluci analytu dochází pomocí methanolu a následuje usušení ve vakuu [95]. Pro chromatografickou analýzu byl použit inovační sorbent C18 s vloženou polární skupinou [95]. Koncentrace kokainu ve vzorku vlasů v metodě popsané Mercolinim [95] dosáhla 1,7 ng/mg. Limit kvantifikace byl stanoven na 0,3 ng/ml a limit detekce na 0,1 ng/ml. Výtěžek extrakce představoval 90 %. Promytím vlasů v methanolu dochází k odstranění interferujících látek účinněji než v případě dichlormethanu, isopropanolu nebo acetonu. Metoda je také levná a rychlejší [95].

Tabulka 11: Koncentrace kokainu ve vlasech [92]

	Koncentrace kokainu [ng/mg]	
Číslo vzorku	**Metoda LC-MS**	**Referenční metoda GC-MS**
1	0,05	0,07
2	0,75	0,78
3	2,25	1,98
4	4,66	2,99
5	21,41	18,45

Stanovení kokainu ve vlasech pomocí LC-MS [92] je vysoce citlivé a selektivní a ukázalo dobrou korelovatelnost s referenční metodou GC-MS (tabulka 11). Spodní hranice kvantifikace byla u této metody stanovena na 0,05 ng/mg. Metoda LC-MS má řadu výhod oproti metodě GC-MS, a to že umožňuje zjednodušení přípravy vzorku (bez čištění a derivatizace požadovaného extraktu), významně také zvyšuje propustnost vzorku. Dále, použití technologie výměny kolon připojených k detekčnímu systému s vysokou citlivostí umožnilo významné

snížení objemu vzorku [92]. Množství kokainu ve vlasech, které potvrzuje užívání drogy, se zpravidla pohybuje okolo 5 ng/mg [95].

Dále je kokain možné analyzovat pomocí kapilární elektroforézy se spektrofotometrickou detekcí [96-98, 100], či spojením CE-MS [99, 101]. Vzorky moči je před analýzou nutné zfiltrovat. Ke vzorku je možné přidat SDS a HCl pro odstranění proteinů. Supernatant je pak následně smíchán s micelárním roztokem [96]. Ke vzorku moči se v některých případech přidává NaOH k upravení pH. Vzorek je poté podroben disperzivní mikroextrakci v systému kapalina-kapalina, za použití isopropanolu (disperzivní rozpouštědlo) a dichlormethanu (extrakční rozpouštědlo) [98]. Vzorek také může být smíchán s acetonitrilem a přímo podroben analýze [99]. Pro analýzu může být využita metoda MSS (hromadění micel do rozpouštědla), která je založena na zvratu účinné elektroforetické mobility nabitých analytů na hranici mezi micelárním roztokem vzorku a roztokem v pozadí [96]. Metoda se vyznačuje dobrou citlivostí, přesností a rychlou analýzou. Pro snížení účinku matrice byly vzorky moči podrobeny jednoduchému předběžnému ošetření k odstranění obsahu bílkovin. V tabulce 12 jsou uvedeny výsledky stanovení koncentrace kokainu ve vzorkách moči. Limita detekce u tohoto stanovení byla 50 ng/ml a limita kvantifikace 75 ng/ml. [96]

Tabulka 12: Koncentrace kokainu v moči [96]

	Přidaná koncentrace kokainu [ng/ml]	**Výtěžek (%) ± SD**	**RSD %**
Kokain	500	85,4±6,7	5,8
	800	98,9±4,3	4,5

Pokud je vzorek pouze smíchán s acetonitrilem [99] dosahuje se výtěžku 83-109 % s relativní standardní odchylkou menší jak 10 %. Limit detekce byl v tomto případě 100 ng/ml a limit kvantifikace 250 ng/ml. Postup přípravy vzorku je velmi jednoduchý a zahrnuje ošetření vzorku moči acetonitrilem a zředěním s elektrolytem. Přímé vstřikování pak ne vždy poskytuje spolehlivé měření. Přidání acetonitrilu však mělo za následek vysrážení proteinů v moči, kde hrozí riziko přilnutí ke kapilárním stěnám, což může ohrozit opakovatelnost měření a zkrátit dobu životnosti kapiláry [99].

Kapilární elektroforéza se vyznačuje vysokou separační účinností, rychlou analýzou a nízkou spotřebou rozpouštědla a vzorků, díky čemuž je platnou alternativou kapalinové chromatografie pro stanovení zneužívání drog [96].

8 Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na tři vybrané alkaloidy, a to na nikotin, kofein a kokain. Bylo zjištěno, že nikotin negativně působí na kardiovaskulární systém prostřednictvím urychlení aterogeneze, zvyšuje riziko rakoviny, podporuje tvorbu žaludečních vředů a indukuje tvorbu volných radikálů. Jako centrální nervový stimulant příznivě působí proti Alzheimerově a Parkinsonově chorobě. Nikotin může být spolehlivě stanoven separační metodou GC-MS, u níž se hojně využívá extrakce v systému kapalina-kapalina a také mikroextrakce tuhou fází za přítomnosti dutého vlákna. Další využívanou metodou je HPLC, u níž jsou přesné výsledky dosaženy extrakcí pomocí dutého vlákna. Pozornost byla dále zaměřena na kofein, u něhož bylo zjištěno, že zvyšuje krevní tlak, podílí se na prevenci vzniku diabetes mellitus 2. typu, vede k nekvalitnímu spánku a zvyšuje pozornost a schopnost učení. Jelikož snižuje koncentraci beta-amyloidu, chrání proti neurodegenerativním onemocněním. Kofein může být stanoven pomocí plynové chromatografie s extrakcí v systému kapalina-kapalina a pomocí kapalinové chromatografie. S výhodou se však využívá kapilární elektroforéza, která poskytuje přesnější výsledky, než GC a LC. Poslední část práce byla věnována kokainu, u něhož bylo zjištěno, že podporuje vznik infarktu myokardu, způsobuje perforaci ústní a nosní dutiny, negativně působí na dýchací systém, způsobuje střevní perforaci a ohrožuje průběh těhotenství. Může být stanoven plynovou chromatografií s využitím mikroextrakce tuhou fází nebo HPLC s extrakcí v systému kapalina-kapalina. Vhodnou alternativou ke kapalinové chromatografii je kapilární elektroforéza, která poskytuje vysokou separační účinnost.

9 Seznam literatury

[1] ANISZEWSKI, Tadeusz Dr. *Alkaloids Chemistry, Biology, Ecology, and Applications.* 2th ed. Amsterdam: Elsevier, 2015. [cit. 26.11.2016] ISBN: 978-0-444-59433-4. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=tQ6dBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=ANISZEWSKI,+Tadeusz+Dr.+Alkaloids+Chemistry,+Biology,+Ecology,+and+Applications.+2th&ots=TkwzHt_rw3&sig=6hYowu2AMcLcvsu4sIqfFlcQl_4&redir_esc=y#v=onepage&q=ANISZEWSKI%2C%20Tadeusz%20Dr.%20Alkaloids%20Chemistry%2C%20Biology%2C%20Ecology%2C%20and%20Applications.%202th&f=false

[2] ROBINSON, Trevor. *The Biochemistry of Alkaloids*. 2th ed. New York: Springer-Verlag, 1981. [cit. 26. 11. 2016] ISBN-13: 978-3-642-61832-1. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=-jjtCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=definition+of+alkaloids&ots=5cizQf3D4b&sig=lIVAJ7h9VPJ_r7FI5EANNtFaBls&redir_esc=y#v=onepage&q=definition%20of%20alkaloids&f=false

[3] ROBERTS Margaret F., WINK, Michael. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. 1st ed. New York: Springer Science+Business Media 1998. [cit. 28.1.2017] ISBN 978-1-4419-3263-1. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=TMEGCAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=alkaloids+history&ots=p4D7dTqRNu&sig=WwytX4QK-kFxVtpp1R0oSeM-1Bg&redir_esc=y#v=onepage&q=alkaloids%20history&f=false

[4] KUTCHAN, Toni M. Alkaloid Biosynthesis-The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell* **1995**, 7, 1059-1070. ISSN 1040-4651.

[5] Nicotine. *The Merck Index** Online [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013. [cit. 8. 2. 1017]. Dostupné z: https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m7879/nicotine?q=authorize

[6] GORROD, John W., PEYTON Jacob, III. *Analytical Determination of Nicotine and Related Compounds and their Metabolites*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1999. [cit. 1. 2. 2017] ISBN 0-444-50095-2. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=-gyynUUv2sAC&oi=fnd&pg=PP1&dq=pyridine+alkaloids+nicotine&ots=2IMSk6gQWd&sig=6CJY-JN5UhNf-9YXMRjFTIJCO6I&redir_esc=y#v=onepage&q=pyridine%20alkaloids%20nicotine&f=false

[7] TAMBWEKAR, Kaustubh R., KAKARIYA, Ritesh B., GARG, Sanjay. A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 32, 441-450. ISSN 0731-7085.

[8] YILDIZ, Deniz. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon* **2004**, 43, 619-632. ISSN 0041-0101.

[9] MARTIN, John W., MOUSA, Shaymaa S., SHAKER, Olfat, MOUSA, Shaker A. The multiple faces of nicotine and its implications in tissue and wound repair. *Experimental Dermatology* **2009**, 18, 497-505. ISSN 0906-6705.

[10] KARAČONJI BRČIĆ, Irena. Facts about nicotine toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **2005**, 56 (4), 363-371. ISSN 0004-1254.

[11] HUKKANEN, Janne, PEYTON, Jacob III., BENOWITZ, Neal L. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Reviews* **2005**, 57, 79-115. ISSN 0031-6997. ISSN 0031-6997.

[12] FAGERSTRÖM, Karl. Nicotine: Pharmacology, Toxicity and Therapeutic use. *Journal of Smoking Cessation* **2014**, 9 (2), 53-59.

[13] JAIN, R., MUKHERJEE, K. Biological basis of nicotine addiction. *Indian Journal of Pharmacology* **2003**, 35, 281-289.

[14] BENOWITZ, Neal L., BURBANK, Andrea D. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. *Trends in Cardiovascular Medicine* **2016**, 26 (6), 515-523. ISSN 1050-1738.

[15] BALAKUMAR, Pitchai, KAUR, Jagdeep. Is nicotine a key player or spectator in the induction and progression of cardiovascular disorders. *Pharmacological Research* **2009**, 60 (5), 361-368. ISSN 1043-6618.

[16] SANNER, Tore, GRIMSRUD, Tom K. Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment-a review. *Frontiers in onkology* **2015**, 5, 1-10. ISSN 2234-943X.

[17] GRANDO, Sergei A. Connections of nicotine to cancer. *Nature reviews cancer* **2014**, 14, 6, 419-429. ISSN 1474-1768.

[18] WU, William K. K., CHO, Chi Hin. The Pharmacological Actions of Nicotine on the Gastrointestinal Tract. *Journal of Pharmacological Sciences* **2004**, 94, 4, 348-358. ISSN 1347-8613.

[19] FAVROD-COUNE, Thierry, BROERS, Barbara. The Health Effect of Psychostimulants: A Literature Review. *Pharmaceuticals* **2010**, 3, 2333-2361. ISSN 1424-8247.

[20] NEWMAN, Mary B., ARENDASH, Gary W., SHYTLE, Douglas R., BICKFORD, Paula C., TIGHE, Thomas, SANBERG, Paul R. Nicotine's oxidative and antioxidant properties in CNS. *Life Sciences* **2002**, 71 (24), 2807-2820. ISSN 0024-3205.

[21] PIAO, Wen-Hua, CAMPAGNOLO, Denise, DAYAO, Carlos, LUKAS, Ronald J., WU, Jie, SHI, Fu-Dong. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacologica Sinica* **2009**, 30 (6), 715-722. ISSN 1745-7254.

[22] WU, Weijia, ASHLEY, David L., WATSON, Clifford H. Determination of Nicotine and Other Minor Alkaloids in International Cigarettes by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2002**, 74 (19), 4878-4884. ISSN 0003-2700.

[23] SHENG, L. Q., DING, L., TONG, H. W., YONG, G.P., ZHOU, X.Z., LIU, S.M. Determination of Nicotine-Related Alkaloids in Tobacco and Cigarette Smoke by GC-FID. *Chromatographia* **2005**, 62 (1-2), 63-68. ISSN 0009-5893.

[24] CAI, Jibao, LIU, Baizhan, LIN, Ping, SU, Quinde. Fast analysis of nicotine related alkaloids in tobacco and cigarette smoke by megabore capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1017 (1-2), 187-193. ISSN 0021-9673.

[25] TORANO, Javier Sastre, VAN KAN, Hendrikus, J.M. Simultaneous determination of the tobacco smoke uptake parameters nicotine, cotinine and thiocyanate in urine, saliva and hair, using gas chromatography-mass spectrometry for characterisation of smoking status of recently exposed subjects. *The Analyst* **2003**, 128 (7), 838-843. ISSN 0003-2654.

[26] SHIN, Ho-Sang, KIM, Jin-Gu, SHIN, Yoon-Jeong, JEE, Sun Ha. Sensitive and simple method for the determination of nicotine and cotinine in human urine, plasma and saliva by gas chromatography–mass spektrometry. *Journal of Chromatography B* **2002**, 769 (1), 177-183. ISSN 1570-0232.

[27] MAN, Che Nin, GAM, Lay-Harn, ISMAIL, Syazwani, LAJIS, Razak, AWANG, Rahmat. Simple, rapid and sensitive assay method for simultaneous quantification of urinari nicotine and cotinine using gas chromatography-mass spektrometry. *Journal of Chromatography B* **2006**, 844 (2), 322-327. ISSN 1570-0232.

[28] MAN, Che Nin, ISMAIL, Syazwani, HARN, Gam Lay, LAJIS Razak, AWANG, Rahmat. Determination of hair nicotine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life science* **2009**, 877 (3), 339-342. ISSN 1570-0232.

[29] HOSSAIN, Amzad M., SALEHUDDIN, Syed M. Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography–mass spektrometry. *Arabian Journal of Chemistry* **2013**, 6 (3), 275-278. ISSN 1878-5352.

[30] SHEN, Jinchao, SHAO, Xueguang. Determination of tobacco alkaloids by gas-chromatography-mass spektrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Analytical Chimica Acta* **2006**, 651 (1-2), 83-87. ISSN 0003-2670.

[31] LOURENCO, Graca Da M., MATOS, Arlete, OLIVEIRA, Conceicao. Gas-liquid chromatographic determination of major tobacco alkaloids. *Journal of Chromatography A* **2000**, 898 (2), 235-243. ISSN 0021-9673.

[32] BEHERA, Digambar, UPPAL, Rajan, MAJUMDAR, Sidharath. Urinary levels of nicotine &cotinine in tobacco users. *Indian Journal of Medical Research* **2003**, 118, 129-133. ISSN 0971-5916.

[33] LIN, Hailu, YAN, Hong, LUO, Mingbiao. Enrichment of Nicotine in Human Plasma and Urine with Ionic Liquid based Liquid Phase Microextraction. *3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics* **2010**, 2038-2040. ISSN 1948-2914.

[34] FIGUEIREDO, Eduardo Costa, DE OLIVEIRA, Mayra Daniela, DE SIGUEIRA, Maria Elisa Pereira Bastos, ARRUDA, Marco Aurelio Zezzi. On-line molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective spectrophotometric determination of nicotine in the urine of smokers. *Analytical Chimica Acta* **2009**, 635 (1), 102-107. ISSN 0003-2670.

[35] WANG, Xu, WANG, Yu, ZOU, Xiaoli, CAO, Yun. Improved dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet method with a binary mixed solvent applied for determination of nicotine and cotinine in urine. *Analytical Methods* **2014**, 6 (7), 2384-2389. ISSN 1759-9679.

[36] NAKAJIMA, Miki, YAMAMOTO, Toshinori, KUROIWA, Yukio, YOKOI, Tsuyoshi. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B* **2000**, 742 (1), 211-215. ISSN 0378-4347.

[37] LIACHENKO, Natalia, BOULAMERY, Audrey, SIMON, Nicolas. Nicotine and metabolites determination in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: a simple approach for solving contamination problem and

clinical application. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2015**, 29 (5), 499-509. ISSN 0767-3981.

[38] MARCLAY, Francois, SAUGY, Martial. Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spektrometry:Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (48), 7528-7538. ISSN 0021-9673.

[39] NIESSEN, Wilfried M. A. Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry. New York: CRC Press, 2001. [cit. 7. 3. 2017] ISBN 0-8247-0473-8. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=fX3JCQlBDf0C&oi=fnd&pg=PR3&dq=NiessenWMA.+(ed.)2001.+Current+practice+of+gas+chromatography-mass+spectrometry.+Marcel+Dekker.&ots=LkNEKd77P5&sig=UA0y23MqdOtRjPS-_8IAGt_XZvY&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

[40] AHUJA, Satinder, DONG, Michael W. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier B.V 2005. [cit. 16. 3. 2017] ISBN 0-12-088547-6. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=k_pD5hlj5DkC&oi=fnd&pg=PP1&dq=+what+is+hplc&ots=PGlquHP-5a&sig=aLtjPBeiDpFk8oBbpv4NGL7UPdc&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

[41] LINDSAY, Sandie. *High Performance Liquid Chromatography*. 2nd ed. London: John Wiley & Sons 1992. [cit. 16. 3. 2017] ISBN 0-471-93115-2. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=08VQA3iChOUC&oi=fnd&pg=PR15&dq=high+performance+liquid+chromatography&ots=Yy7jsKF_CV&sig=2UYVNhGm5o2kKk91lmHrW2mhgSs&redir_esc=y#v=onepage&q=high%20performance%20liquid%20chromatography&f=false

[42] Caffeine. *The Merck Index** Online [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2017. Last Revised 2013. [cit. 20. 3. 2017] Dostupné z: https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m2909/caffeine?q=authorize

[43] MUMIN, Abdul Md., AKHTER, Farida Kazi, ABEDIN, Zainal Md., HOSSAIN, Zakir Md. Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE – HPLC). *Malaysian Journal of Chemistry* **2006,** 8 (1), 045-046.

[44] HECKMAN, Melanie A., WEIL, Jorge, DE MEJIA, Elvira Gonzales. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *Journal of Food Science* **2010**, 75 (3), R77-R87. ISSN 0022-1147.

[45] LORIST, Monicque M., TOPS, Mattie. Caffeine, fatigue, and cognition. *Brain and Cognition* **2003**, 53 (1), 82-94. ISSN 0278-2626.

[46] FREDHOLM, Bertil B., BÄTTIG, Karl, HOLMÉN, Janet, NEHLIG, Astrid, ZVARTAU, Edwin E. Actions of Caffeine in the Brain with Special Reference to Factors That Contribute to Its Widespread Use. *Pharmacological Reviews* **1999**, 51 (1), 83-133. ISSN 0031-6997.

[47] RIBEIRO, Joaquim A., SEBASTIÃO, Ana M. Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimers Disease* **2010**, 20, S3-S15. ISSN 1387-2877.

[48] RIKSEN, Niels P., RONGEN, Gerard A., SMITS, Paul. Acute and long-term cardiovascular effects of coffee: Implications for coronary heart disease. *Pharmacology & Therapeutics* **2009**, 121 (2), 158-191. ISSN 0163-7258.

[49] CANO-MARQUINA, A., TARÍN, J. J., CANO, A. The Impact of coffee on health. *Maturitas* **2013**, 75 (1), 7-21. ISSN 0378-5122.

[50] AKASH, Muhammad Sajid Hamid, REHMAN, Kanwal, CHEN, Shuqing. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus. *Nutrition* **2014**, 30 (7-8), 755-763. ISSN 1873-1244.

[51] MAXOVÁ, Martina. Can coffee consumption affect the risk of developing type 2 diabetes? *Klinicka Farmakologie a Farmacie* **2009**, 23 (2), 83-85. ISSN 12127973.

[52] MORISCO, Filomena, LEMBO, Vincenzo, MAZZONE, Giovanna, CAMERA, Silvia. Voffee and Liver Health. *Journal of Clinical Gastroenterology* **2014**, 48, S87-S90. ISSN 1539-2031.

[53] ROEHRS, Timothy, ROTH, Thomas. Caffeine: Sleep and daytime sleepiness. *Sleep Medicine Reviews* **2008**, 12 (2), 153-162. ISSN 1087-0792.

[54] GLADE, Michael J. Caffeine-Not just a stimulant. *Nutrition* **2010**, 26 (10), 932-938. ISSN 0899-9007.

[55] LARA, Diogo R. Caffeine, Mental Health, and Psychiatric Disorders. *Journal of Alzheimers Disease* **2010**, 20 (S239-S248). ISSN 1875-8908.

[56] YENISETTI, S. C., MURALIDHARA. Beneficial Role of Coffee and Caffeine in Neurodegenerative Diseases: A Minireview. *Aims Public Health* **2016**, 3 (2), 407-422. ISSN 2327-8994.

[57] SERESHTI, Hassan, SAMADI, Soheila. A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages. *Food Chemistry* **2014**, 158, 8-13. ISSN 1873-7072.

[58] SHRIVAS, Karnlesh, WU, Hui-Fen. Rapid determination of caffeine in one drop of beverages and foods using drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1170 (1-2), 9-14. ISSN 0021-9673.

[59] ZOU, Jiankai, ZHANG, Haijuan, DING, Mingzhen, SHANG, Zhicai. Large Phase Ratio Spontaneous Extraction Followed by GC-MS for the Determination of Caffeine in Beverages. *Chromatographia* **2010**, 71 (3-4), 323-326. ISSN 0009-5893.

[60] ZOU, Jiankai, LI, Na. Simple and environmental friendly procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of caffeine in beverages. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1136 (1), 106-110. ISSN 0021-9673.

[61] PERRONE, Daniel, DONANGELO, Carmen Marino, FARAH, Adriana. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **2008**, 110 (4), 1030-1035. ISSN 0308-8146.

[62] MUMIN, Abdul, AKHTER, Kazi Farida, ABEDIN, Zainal, HOSSAIN, Zakir. Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee and Soft Drinks by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE – HPLC). *Malaysian Journal of Chemistry* **2006**, 8 (1), 045-051. ISSN 045-051.

[63] TZANAVARAS, Paraskevas D., THEMELIS, Demetrius G. Development and validation of a high-throughput high-performance liquid chromatographic assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column. *Analytica Chimica Acta* **2007**, 581 (1), 89-94. ISSN 0003-2670.

[64] AL-OTHMAN, Zeid A., AQEL, Ahmad, ALHARBI, Muteb K. E., BADJAH-HADJ-AHMED, A. Yacine, AL-WARTHAN, Abdulrahman A. Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillary hexyl methacrylate monolithic column. *Food Chemistry* **2012**, 132 (4), 2217-2223. ISSN 0308-8146.

[65] BISPO, M. S., VELOSO, M. C. C., PINHEIRO, H. L. C., DE OLIVEIRA, R. F. S., REIS J. O. N, DE ANDRADE, J. B. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2002**, 40 (1), 45-48. ISSN 0021-9665.

[66] GLISZCZYNSKA-SWIGLO, Anna, RYBICKA, Iga. Simultaneous Determination of Caffeine and Water-Soluble Vitamins in Energy Drinks by HPLC with Photodiode Array and Fluorescence Detection. *Food Analytical Methods* **2015**, 8 (1), 139-146. ISSN 1936-9751.

[67] TURAK, Fatma, GUZEL, Remziye, DINC, Erdal. Simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine in commercial soft drinks using reversed-phase ultraperformance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* **2017**, 25 (2), 285-292. ISSN 1021-9498.

[68] VOCHYANOVA, Blanka, OPEKAR, Frantisek, TUMA, Petr. Simultaneous and rapid determination of caffeine and taurine in energy drinks by MEKC in a short capillary with dual contactless conductivity/photometry detection. *Electrophoresis* **2014**, 35 (1), 1660-1665. ISSN 1522-2683.

[69] BALLUS, Cristiano Augusto, MEINHART, Adriana Dillenburg, BIZZOTTO, Carolina Schaper, TEIXEIRA, Filho Jose, GODOY, Helena Teixeira. A fast and efficient method for the study of caffeine levels in energy drinks using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* **2012**, 32 (2), 401-404. ISSN 0101-2061.

[70] INJAC, Rade, SRDJENOVIC, Branislava, PRIJATELJ, Matevz, BOSKOVIC, Marija, KARLJIKOVIC-RAJIC, Katarina, STRUKEJL, Borut. Determination of caffeine and associated compounds in food, beverages, natural products, pharmaceuticals, and cosmetics by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2008**, 46 (2), 137-143. ISSN 0021-9665.

[71] LI, Mengjia, ZHOU, Junyi, GU, Xue, WANG, Yan, HUANG, Xiaojing, YAN, Chao. Quantitative capillary electrophoresis and its application in analysis of alkaloids in tea, coffee, coca cola, and theophylline tablets. *Journal of Separation Science* **2009**, 32 (2), 267-274. ISSN 1615-9314.

[72] KHASANOV, V.V., SLIZHOV, Yu, G. Energy Drink Analysis by Capillary Electrophoresis. *Journal of Analytical Chemistry* **2013**, 68 (4), 357-359. ISSN 1061-9348.

[73] LANDERS, James P. *Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group 2008. [cit. 13.6.2017] Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=lG6UcaKFJpgC&oi=fnd&pg=PA109&dq=

micellar+electrokinetic+chromatography&ots=u0c5uQn-sW&sig=oNULvamSJup5FBsztqLq_Qi3CwY&redir_esc=y#v=onepage&q=micellar%20electrokinetic%20chromatography&f=false

[74] Cocaine. *The Merck Index** Online [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry ©2017. Last Revised 2013. [cit. 17. 4. 2017]. Dostupné z: https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m3710/cocaine?q=authorize

[75] Cocaine. Toxnet ® [online]. Bethesda: U.S. National Library of Medicine ©2005. Last Update 11. 4. 2017. [cit. 18. 4. 2017]. Dostupné z: https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~kvu6Y9:3

[76] JATLOW, Peter. Cocaine-Analysis, Pharmacokinetics and Metabolic Disposition. *Yale Journal of Biology and Medicine* **1988**, 61 (2), 105-113. ISSN 0044-0086.

[77] CARRERA, M. Rocío A., MEIJLER, Michael M., JANDA, Kim D. Cocaine pharmacology and current pharmacothetherapies for its abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12 (19), 5019-5030. ISSN 0968-0896.

[78] BOUCHER, Douglas H., MOESER, Vicki. Cocaine and the Coca plant. *Bioscience* **1991**, 41 (2), 72-76. ISSN 0006-3568.

[79] CRUMB, William J., CLARKSON, Craig W. Characterization of cocaine-induced block of cardiac sodium channels. *Biophysical Journal* **1990**, 57 (3), 589-599. ISSN 0006-3495.

[80] PHILLIPS, Katharine, LUK, Adriana, SOOR, Gursharan S., ABRAHAM, Jonathan R., LEONG, Shaun, BUTANY, Jagdish. Cocaine Cardiotoxicity A Review of the Pathophysiology, Pathology and Treatment Options. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **2009**, 9 (3), 177-196. ISSN 1175-3277.

[81] BRAND, H. S., GONGGRIJP, S., BLANKSMA, C. J. Cocaine and oral health. *British Dental Journal* **2008**, 204 (7), 365-369. ISSN 0007-0610.

[82] GLAUSER, Jonathan, QUEEN, John R. An overview of non-cardiac cocaine toxicity. *Journal of Emergency medicine* **2007**, 32 (2), 181-186. ISSN 0736-4679.

[83] FARINA, M., YONAMINE, M., SILVA, O.A. One-step liquid-liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis. *Forensic Science International* **2002**, 127 (3), 204-207. ISSN 0379-0738.

[84] BRACHET, A., CHRISTEN, P., GAUVRIT, J.Y., LONGERAY, R., LANTERI, P., VEUTHEY, J. L. Experimental desing in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2000**, 43 (1-3), 353-366. ISSN 0165-022X.

[85] BRACHET, A., CHRISTEN, P., VEUTHEY, J. L. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochemical Analysis* **2002**, 13 (3), 162-169. ISSN 0958-0344.

[86] ROSADO, Tiago, GONCALVES, Alexandra, MARGALHO, Claudia, BARROSO, Mario, GALLARDO, Eugenia. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2017**, 409 (8), 2051-2063. ISSN 1618-2650.

[87] YONAMINE, Mauricio, SAVIANO, Alessandro Morais. Determination of cocaine and cocaethylene in urine by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **2006**, 20 (10), 1071-1075. ISSN 0269-3879.

[88] BIERI, S., ILIAS, Y., BICCHI, C., VEUTHEY, J. L., CHRISTEN, P. Focused microwave-assisted extraction combined with solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the selective analysis of cocaine from coca leaves. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1112 (1-2), 127-132. ISSN 0021-9673.

[89] PEGO, A. M. F., ROVERI, F. L., KUNINARI, R. Y., LEYTON, V., MIZIARA, I. D., YONAMINE, M. Determination of cocaine and its derivates in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Science International* **2017**, 274, 83-90. ISSN 1872-6283.

[90] JANICKA, Monika, KOT-WASIK, Agata, NAMIESNIK, Jacek. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2010**, 29 (3), 209-224. ISSN 0165-9936.

[91] SANCHEZ-GONZALEZ, Juan, GARCIA-CARBALLAL, Sara, CABARCOS, Pamela, JESUS TABERNERO, Maria, BERMEJO-BARRERA, Pilar, MOREDA-PINEIRO, Antonio. Determination of cocaine and its metabolites in plasma by porous membrane-protected molecularly imprented polymer micro-solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1451 (15-22). ISSN 1873-3778.

[92] RABELO ALVES, Marcela Nogueira, ZANCHETTI, Gabriele, PICCINOTTI, Alberto, TAMENI, Silvia, DE MARTINIS, Bruno Spinosa, POLETTINI, Aldo. Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405 (19), 6299-6306. ISSN 1618-2642.

[93] LIU, Yongzhen, ZHENG, Bo, STRAFFORD, Stephanie, ORUGUNTY, Ravi, SULLIVAN, Michael, GUS, Jeffrey, HEIDBREDER, Christian, FUDALA, Paul J., NASSER, Azmi. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite(-)ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma samples. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science* **2014**, 961, 77-85. ISSN 1873-376X.

[94] FERNÁNDEZ, P., REGENJO, M., BERMEJO, A. M., FERNÁNDEZ, A.M., LORENZO, R.A., CARRO, A.M. Analysis of drugs of abuse in human plasma by disperzive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Toxicology* **2015**, 35 (4), 418-425. ISSN 1099-1263.

[95] MERCOLINI, Laura, MANDRIOLI, Roberto, SALADINI, Bruno, CONTI, Matteo, BACCINI, Cesare, RAGGI, Maria Augusta. Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2008**, 48 (2), 456-461. ISSN 0731-7085.

[96] ATURKI, Zeineb, FANALI, Salvatore, ROCCO, Anna. Online sample concentration and analysis of drugs of abuse in human urine by micelle to solvent stacking in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* **2016**, 37 (21), 2875-2881. ISSN 1522-2683.

[97] BACIU, Tatiana, BORRULL, Francesc, AGUILAR, Carme, CALULL, Marta. Findings in the hair of drug abusers using pressurized liquid extraction and solid-phase extraction

coupled in-line with capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Bomedical Analysis* **2016**, 131, 420-428. ISSN 1873-264X.

[98] KOHLER, Isabelle, SCHAPPLER, Julie, SIERRO, Tatiana, RUDAZ, Serge. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis. *Journal of Pharmaceutical and Bomedical Analysis* **2013**, 73, 82-89. ISSN 0731-7085.

[99] DA COSTA, Jose Luiz, TONIN, Fernando Gustavo, ZANOLLI, Luiz Antonio, CHASIN, DA MATTA CHASIN, Alice Aperecida, MAGGI TAVARES, Marina Franco. Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS. *Electrophoresis* **2009**, 30 (12), 2238-2244. ISSN 0173-0835.

[100] GOTTARDO, Rossella, BORTOLOTTI, Federica, DE PAOLI, Giorgia, PASCALI, Jennifer Paola, MIKSIK, Ivan, TAGLIARO, Franco. Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1159 (1-2), 185-189. ISSN 0021-9673.

[101] GOTTARDO, Rossella, FANIGLIULO, Ameriga, BORTOLOTTI, Federica, DE PAOLI, Giorgia, PASCALI, Jennifer Paola, TAGLIARO, Franco. Broad-spectrum toxicological analysis of hair based on capillary zone electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1159 (1-2), 190-197. ISSN 0021-9673.