Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení nikotinu a jeho metabolitů v moči

Bakalářská práce

2025 Jana Mušková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Jana Mušková**
Osobní číslo:	**C22011**
Studijní program:	**B0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce:	**Stanovení nikotinu a jeho metabolitů v moči**
Téma práce anglicky:	**Determination of Nicotine and Its Metabolites in Urine**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Úvodní část zaměřte na nikotin a jeho vliv na lidský organismus včetně jeho metabolismu. Proveďte literární rešerši zabývající se stanovením nikotinu a jeho metabolitů v moči. Stručně popište využívané analytické metody používané pro jejich kvalitativní a kvantitativní stanovení.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem stanovení nikotinu a jeho metabolitů v moči 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 6. 2025

Jana Mušková 2025

PODĚKOVÁNÍ

V této části bych ráda poděkovala vedoucímu své práce Ing. Aleši Eisnerovi Ph.D. za jeho cenné rady, ochotu a věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala svojí rodině, příteli a kamarádům za podporu při psaní této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení nikotinu a jeho metabolitu kotininu v lidské moči. První část práce se zabývá chemickými a biologickými vlastnostmi nikotinu a kotininu, zejména metabolismu nikotinu, absorpce, distribuce a vylučování z organismu. Druhá část práce popisuje a srovnává analytické metody, které se využívají pro stanovení těchto látek. Důraz je kladen hlavně na chromatografické techniky, a to plynovou a kapalinovou chromatografii. Srovnávacími parametry jsou citlivost, výtěžnost, způsob úpravy vzorku a další parametry z jednotlivých studií dle dostupnosti požadovaných hodnot.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nikotin, kotinin, moč, stanovení, chromatografie

TITLE

Determination of nicotine and its metabolites in urine

ANNOTATION

This bachelor‘s thesis focuses on the determination of nicotine and its metabolite cotinine in human urine. The first part of the thesis deals with the chemical and biological properties of nicotine and cotinine, particularly nicotine metabolism, absorption, distribution and excretion from the body. The second part of the thesis describes and compares the analytical methods used for the determination of these substances. The emphasis is mainly on chromatographic techniques, namely gas and liquid chromatography. The comparative parameters are sensitivity, recovery, methods of sanple modification, and other parameters from individual studies according to the availability of the required values.

KEYWORDS

Nicotine, cotinine, urine, determination, chromatography

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK 9
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK 10
ÚVOD 12
1 NIKOTIN 13
1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 13
1.2 Absorpce a distribuce 14
1.3 Metabolismus 15
1.4 Exkrece 16
1.5 Pozitivní a negativní důsledky nikotinu na lidské tělo 16
2 KOTININ 17
2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti 17
3 ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ NIKOTINU A KOTININU V MOČI 18
3.1 Chromatografické metody 18
3.1.1 Stanovení pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem 18
3.1.1.1 Úprava vzorku 19
3.1.1.2 Analýza pomocí SPE-GC-MS 21
3.1.1.3 Analýza pomocí LLE-GC-MS 22
3.1.1.4 Analýza pomocí DLLME-GC-MS 22
3.1.1.5 Analýza pomocí MEPS-GC-MS 23
3.1.1.6 Výsledky GC-MS analýz a srovnání 23
3.1.2 Stanovení pomocí plynové chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem 25
3.1.3 Stanovení pomocí kapalinové chromatografie 25
3.1.3.1 Úprava vzorku 26
3.1.3.2 Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií 29
3.1.3.3 Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem 35
3.1.3.4 Stanovení pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem 35
ZÁVĚR 39

POUŽITÁ LITERATURA 40

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Strukturní vzorec nikotinu (S)-izomeru (vlevo) a (R)-izomeru (vpravo) [4].....13
Obrázek 2: Metabolismus nikotinu [11].....15
Obrázek 3: Strukturní vzorec kotininu [18].....17
Obrázek 4: Ukázkový chromatogram vzorku moči s píky nikotinu (1), IS (2) a kotininu (3) [34].....23
Obrázek 5: Ukázkový chromatogram nikotinu, trans-3'-hydroxykotininu, kotininu, nornikotinu, anabasinu a jejich IS ve vzorku moči s koncentracemi 20 ng/ml pro nikotin, 50 ng/ml pro kotinin, 100 ng/ml pro trans-3'-hydroxykotinin, 20 ng/ml pro nornikotin a 5 ng/ml pro anabasin [46].....33
Obrázek 6: MRM chromatogramy vzorků moči nikotinu a kotininu obohacených o hodnoty LOD (vlevo), abstinentů bez expozice (uprostřed) a pasivních kuřáků (vpravo) [40].....33
Obrázek 7: Hmotnostní spektra molekulových iontů nikotinu a jeho IS [45].....37
Obrázek 8: Hmotnostní spektra molekulových iontů kotininu a jeho IS [45].....37

Tabulka 1: Výhody a nevýhody SPE, LLE, DLLME, MEPS metod pro úpravu vzorku [29; 30; 31; 32; 33; 34].....19
Tabulka 2: Srovnání GC-MS analýz na základě rozdílné úpravy vzorku [29; 30; 31; 32; 33; 34].....24
Tabulka 3: Výhody a nevýhody SPE, LLE, proteinové precipitace, centrifugace + filtrace, enzymatické hydrolýzy a on-line SPE metod pro úpravu vzorku [39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52].....29
Tabulka 4: Souhrn stanovovaných analytů, hodnoty LOD a LOQ, výtěžnost, RSD a způsob úpravy vzorku pro LC-MS/MS analýzy z předešlých studií [39; 40; 42; 46; 47; 50; 51; 52]..34
Tabulka 5: Souhrn stanovovaných analytů, hodnoty LOD a LOQ, výtěžnost, RSD a způsob úpravy vzorku u analýzy HILIC-MS/MS [43; 44; 49].....38

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CNS – centrální nervová soustava

CYP 2A6 – cytochrom P 2A6

CYP 450 – cytochrom P 450

UGT 2B10 – 5‘-difosfo-glukuronosyltransferáza 2B10

UGT 2B17 – 5‘-difosfo-glukuronosyltransferáza 2B17

FMO 3 – flavinová monooxygenáza 3

LD_{50} – dávka, která způsobí úhyn 50 % jedinců do 24 hodin po požití

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HILIC – hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

GC-NPD – plynová chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem

ELISA – enzymová imunoanalýza

RIA – radioimunoanalýza

FIA – průtoková injekční analýza

GC – plynová chromatografie

SPE – extrakce na tuhém sorbentu

LLE – extrakce kapalina-kapalina

DLLME – disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina

MEPS – mikroextrakce na sorbent v jehle stříkačky

IS – vnitřní standard

TMS – trimetylchlorsilan

BSTFA - N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid

ACN – acetonitril

HP-5MS – kolona Uptibond® UB5 premium

EI – elektronová ionizace

SIM – monitorování vybraných iontů

COT – kotinin

OH-COT – trans-3‘-hydroxykotinin

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

RSD – relativní směrodatná odchylka

LC – kapalinová chromatografie

UHPLC – ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-MS/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

QqQ – systém trojitý kvadrupól

ESI – elektrosprejová ionizace

API – ionizační rozhraní s atmosférickým tlakem

ÚVOD

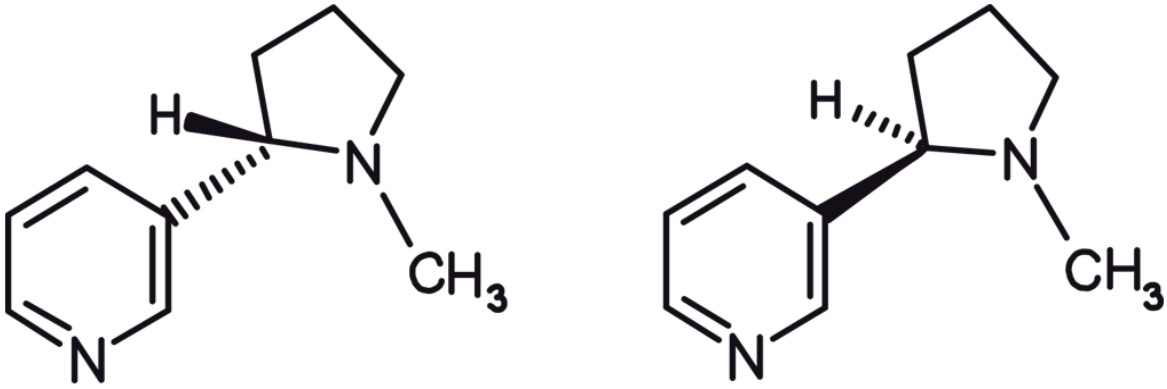
Nikotin je jednou z nejznámějších a nejvyužívanějších psychoaktivních látek, obsaženou zejména v tabákových výrobcích. Účinky nikotinu jsou rozsáhlé. Nikotin ovlivňuje především centrální nervovou soustavu a u uživatelů navozuje závislost. Přestože je nikotin vnímán hlavně negativně, určité studie poukázaly i na jeho pozitivní účinky na lidské tělo. Hlavní roli hraje především podaná dávka a délka expozice.

Po vstřebání do organismu nikotin rychle přechází metabolickými cestami na kotinin, který se v těle udržuje podstatně déle. Z tohoto důvodu je kotinin nejčastěji využíván jako biomarker pro stanovení expozice nikotinu. Moč jako snadno dostupný a neinvazivně získatelný biologický materiál dobře slouží pro eventuální stanovování nikotinu a kotininu. Koncentrace kotininu v lidském těle je stabilnější než koncentrace nikotinu. Zároveň kotinin tvoří zásadně největší množství všech metabolitů v moči, proto jsem se v této práci chtěla zaměřit výhradně na tento metabolit.

Cílem této práce bylo shrnout obecné informace o nikotinu a jeho nejdůležitějšího metabolitu kotininu pro efektivní zjištění dané expozice nikotinu a zejména shrnout nejvyužívanější a nejvhodnější analytické metody hlavně pro kvalitativní stanovení nikotinu a kotininu v moči. Hlavní důraz byl kladen na chromatografické techniky, které jsou pro svoji vysokou citlivost a spolehlivou detekci nejpoužívanější pro stanovení těchto látek.

1 NIKOTIN

Alkaloidy patří mezi dusíkaté organické sloučeniny, které se vyskytují v rostlinách jako přírodní insekticidy. Mezi ně můžeme zařadit i nikotin se svým sumárním vzorcem $C_{10}H_{14}N_2$ a názvem 3-[(2*S*)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridin. V přírodě se nachází hlavně v listech rostliny *Nicotiana tabacum*, díky níž sloučenina získala i svůj název, jenž je odvozen od francouzského velvyslance Jean Nicota, který stál za prvním využitím tabáku. Skládá se z pyridinového a pyrrolidinového kruhu, což značně ovlivňuje jeho acidobazické vlastnosti. V tabáku je nikotin z větší části jako levotočivý (S)-izomer, (R)-izomer je v množství menším než jedno procento. Oba tyto izomery jsou znázorněny na obrázku 1 [1; 2; 3].



Obrázek 1: Strukturní vzorec nikotinu (S)-izomeru (vlevo) a (R)-izomeru (vpravo) [4]

1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Sloučenina nikotinu se vyskytuje v kapalném stavu, která je bezbarvá až světle žlutá. Svým charakteristickým zápachem připomíná ryby. Jeho molekulová hmotnost je 162,2 g/mol. Teplota varu se uvádí 250 °C a teplota tuhnutí −78,89 °C. S vodou je dobře mísitelný. Ještě lepší rozpustnost poskytuje v alkoholu, chloroformu a různých olejích. Hustotou dokáže mírně předčit vodu, při 20 °C je 1,009 g/cm^3. Na vzduchu přibývá na viskozitě a kvůli oxidaci mění barvu do hněda. Kvůli pyridinovému a pyrrolidinovému dusíku v molekule nikotinu je záporná logaritmická hodnota disociační konstanty nikotinu (pK_a) při 25 °C 7,84 a 3,04. Jedná se o slabou zásadu. Vyskytuje se ve formě ionizované soli v kyselém prostředí a ve formě neionizované volné báze [3; 4; 5].

1.2 Absorpce a distribuce

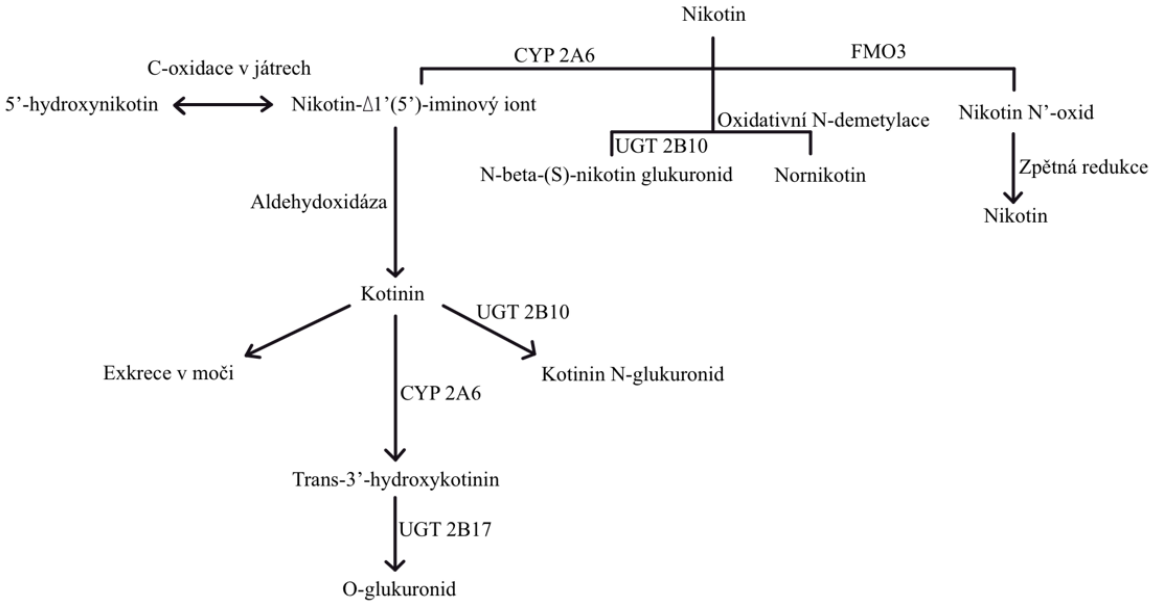
Způsob vstřebávání ovlivňuje především hodnota pH. Pro snadnější vstup přes fosfolipidovou membránu je zapotřebí lipofilních látek, což nikotin zastává ve své nenabité formě. Její podíl se značně zvedá při zvýšení pH. Při zvýšení pH se zvýší i rychlost absorpce [6].

Cesty absorpce vedou skrz ústní dutinu do plic, kůži a přes močový měchýř či žaludek. Po průchodu membránou látka putuje dále krví do tkání a orgánů. Pro neinhalující kuřáky dochází k absorpci bukální sliznicí. Tabákový kouř má pH 5,5, nikotin je tedy absorbován ústní sliznicí v malé míře. Nejefektivnější cestou inhalujících kuřáků je přes plicní alveoly, které poskytují podstatně velkou plochu pro lepší absorpci. Nikotin ve vodné frakci cigaretového kouře s pH 8,5 prostupuje plicní tekutinou s pH kolem 7,5 přes buněčnou membránu do krevního oběhu. V játrech dochází k efektu prvního průchodu, přičemž se koncentrace nikotinu sníží výslednými metabolickými procesy. Dochází tím k oslabení konečného účinku nikotinu. V žaludku se v důsledku vysoké acidity žaludečních šťáv nikotin vstřebává minimálně. Transdermální aplikace je důležitá především pro odvykací kúry. V močovém měchýři dochází k reabsorpci extrahovaného nikotinu, která nemůže nastat, pokud je pH moči menší než 6,0 [6; 7].

Nikotin působí zejména jako stimulant centrální nervové soustavy (CNS), kde začíná působit už 10-20 vteřin po užití. V mozku využívá ligandově řízené iontové kanály, především nikotinové receptory. Navázáním nikotinu na nikotinové acetylcholinové receptory dochází k uvolnění acetylcholinu, norepinefrinu, dopaminu, serotoninu a dalších hormonů pro aktivaci sympatiku. Ten se projevuje dilatací zorniček a průdušek, sníženou sekrecí slin, zvýšením krevního tlaku a srdeční frekvence. Jedná se o autonomní nervový systém, který uvádí tělo do stavu euforického a příjemného, a proto u uživatelů automaticky vzniká potřeba látku užívat znovu [8; 9; 10].

1.3 Metabolismus

K hlavním metabolickým procesům dochází v játrech. Zhruba 80 % nikotinu je degradováno na kotinin, který lze jako biomarker následně stanovovat. Kotinin enzymem cytochrom P2A6 (CYP 2A6) ze skupiny cytochrom P450 (CYP 450) oxiduje na trans-3‘-hydroxykotinin nebo enzymem uridin 5‘-difosfo-glukuronosyltransferáza 2B10 (UGT 2B10) podléhá glukuronidaci a vzniká kotinin N-glukuronid. Trans-3‘-hydroxykotinin nakonec tvoří O-glukuronidové konjugáty enzymem uridin 5‘-difosfo-glukuronosyltransferáza 2B17 (UGT 2B17). Ještě před kotininem se pomocí enzymu CYP 2A6 nikotin transformuje na nikotin-Δ1‘(5‘)-iminový iont, který snadno přechází na 5‘-hydroxynikotin. Nikotin-Δ1‘(5‘)-iminový iont dále oxiduje aldehydoxidázou v cytoplazmě na kotinin. Další cestou přeměny nikotinu je působením enzymu flavinová monooxygenáza 3 (FMO 3), kdy vzniká nikotin-N‘-oxid snadno redukovatelný zpět na nikotin v intestinálním epitelu. Oxidativní N-demetylací nikotin přechází na nornikotin. Při posledním procesu N-glukuronidace nikotin enzymem UGT 2B10 transferuje na N-beta-(S)-nikotin glukuronid. Celé schéma metabolismu nikotinu je znázorněno na obrázku 2 [11; 12].



Obrázek 2: Metabolismus nikotinu [11]

1.4 Exkrece

Pro stanovení či analýzu nikotinu je zapotřebí jeho vyloučení z těla. Nikotin je však během metabolických procesů zcela téměř přeměněn na své metabolity, které můžeme následně sledovat v krvi, moči, slinách a ve vlasech. Jedná se především o kotinin, nornikotin a trans-3‘-hydroxykotinin. Ostatní metabolity se nachází v nízkých koncentracích [11].

1.5 Pozitivní a negativní důsledky nikotinu na lidské tělo

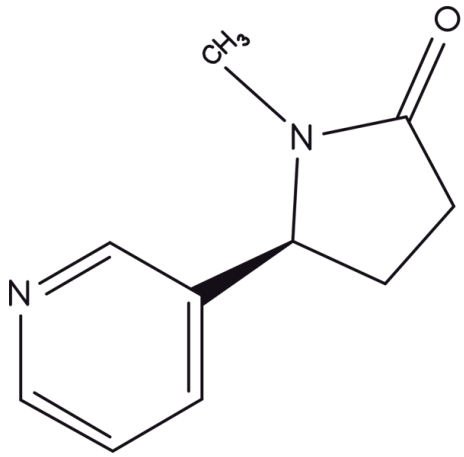
Nikotin je z celkového hlediska brán spíše negativně, ačkoliv se při užívání dostupných tabákových výrobků do těla dostává více jiných mnohem toxičtějších látek. V potaz je důležité brát zvláště koncentraci dávky a čas jejího podání. Dle studie [13] se dá mluvit i o pozitivních účincích, a to zejména v mitochondriálních funkcích, s onemocněními spojenými s nervovým systémem nebo využitím jeho analgetických účinků.

Nikotinamidadenindinukleotid účastnící se ve vnitřní mitochondriální membráně na dýchacím řetězci při oxidativní fosforylaci v komplexu I a nikotin se mírně strukturně podobají. Dochází tedy k jeho nahrazení a v určité formě snížení produkce reaktivních forem kyslíku. Dále dokáže zvýšit expresi genu pro zajištění správné funkce mitochondrií, či chránit buňky regulací iontových kanálů ovlivňováním proudění vápenatých a sodných iontů v mitochondriích. Díky jeho účinkům na CNS se ukázal i pozitivní dopad u pacientů s neurodegenerativním onemocněním např. Alzheimerovou, Parkinsonovou chorobou nebo u lidí trpících schizofrenií [13; 14; 15].

Při velkých a chronických dávkách dochází k jeho toxikologickému účinku. Dávka, která způsobí úhyn 50 % jedinců do 24 hodin po požití (LD_{50}) je i po mnoha letech přezkoumávání stanovena jako 0,5 – 1 mg/kg pro dospělého člověka. Nemluvě o aktivaci oxidativního stresu, abnormálních epigenetických mutacích a zvýšené zánětlivé reakce. Nikotin zasahuje i do mikrobiálního složení jak v intestinálním traktu, tak obecně v lidském těle [13; 16].

2 KOTININ

Kotinin se jménem (5S)-1-methyl-5-pyridin-3-ylpyrrolidin-2-on a sumárním vzorcem $C_{10}H_{12}N_2O$ patří také mezi alkaloidy, které můžeme nalézt v rostlině *Nicotiana tabacum*. Využívá se hlavně jako biomarker pro stanovení užitého množství nikotinu, ale zároveň i on sám prokazuje stimulující účinky na CNS. Nikotin prokazuje vyšší afinitu na působící receptory než kotinin, proto výsledné účinky kotininu na CNS nejsou příliš velké. Dle přiloženého obrázku 3 se od nikotinu liší existencí ketonové skupiny na pyrrolidinovém kruhu [17].



Obrázek 3: Strukturní vzorec kotininu [18]

2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Vyskytuje se ve formě krystalů s molekulovou hmotností 176,21 g/mol. Teplota tání se pohybuje od 40-42 °C a teplota varu je 250 °C. Hustotu má s hodnotou 1,1102 g/cm^3 trochu vyšší než nikotin a stejně jako on je dobře mísitelný s vodou. Rozpustný je v chloroformu, ethanolu, metanolu a dimetylsulfoxidu. Bez úprav bývá bezbarvý či tmavě oranžový. Hodnota pK_a je 4,72 [19; 20].

Biologický poločas rozpadu, tedy doba, kdy se koncentrace dané látky sníží na polovinu, je u nikotinu stanovena jako 2–3 hodiny, zatímco kotinin v těle ve své formě setrvává o mnoho déle – až 20 hodin. I koncentrace kotininu v krvi je daleko vyšší než u nikotinu, proto je nejčastější stanovování kotininu jako biomarkeru expozice nikotinu nežli stanovování nikotinu samotného. Jako biologický materiál je nejčastěji používána moč pro její neinvazivnost při odběru [21; 22].

3 ANALYTICKÉ METODY PRO STANOVENÍ NIKOTINU A KOTININU V MOČI

Pro stanovení nikotinu a kotininu v moči se nejčastěji používají chromatografické metody. Jedná se zejména o vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), hydrofilní interakční kapalinovou chromatografií (HILIC) a plynovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) či s detektorem zaměřujícím se na dusík, například dusíko-fosforovým (GC-NPD). V praxi se využívají zejména imunoanalytické metody: enzymová imunoanalýza (ELISA) a radioimunoanalýza (RIA) [23; 24].

3.1 Chromatografické metody

Chromatografie je založena na principu separačních technik v důsledku rozdílností fyzikálních a chemických vlastností dvou fází. Mobilní fáze nese požadovanou analyzovanou látku přes stacionární fázi, kde dochází k interakcím a rozdělení složek pro detekci cílového analytu. Chromatografie se dále dělí dle typu používaných fází či instrumentace [25; 26].

3.1.1 Stanovení pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem

Mobilní fází plynové chromatografie (GC) je nosný plyn. Nosný plyn dále nese vzorek do kolony, kde se nachází stacionární fáze. Zde dochází k separaci obsažených látek. Stacionární fází může být pevná adsorbční látka nebo netěkavá kapalina. Pro využití kapalného vzorku k analýze je zapotřebí nastavení teplotního programu, díky níž je vzorek převeden na plyn. Detektor, který je součástí zařízení, umožňuje identifikaci a kvantifikaci stanovované látky i dalších příměsí. Na zobrazovacím zařízení vzniká chromatogram odezvy signálu na čase. Na základě retenčního času lze jednotlivé složky vzorku identifikovat. Srovnáním ploch pod píky s kalibrační křivkou standardů o známé koncentraci lze požadované složky kvantifikovat [27; 28].

3.1.1.1 Úprava vzorku

Ještě před analýzou je zapotřebí vzorek moči s analytem upravit. Pro metodu GC-MS se běžně používají techniky extrakce na pevné fázi (SPE), extrakce kapalina-kapalina (LLE), disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) a mikroextrakce na sorbent v jehle stříkačky (MEPS). SPE metoda umožňuje využití rozdílných objemů vzorku a její vícekrokové promývání zajišťuje vyšší čistotu. Práce zahrnuje i mnoho kroků, proto je spíše časově náročnější, avšak velmi přesná. Metoda DLLME je v porovnání s LLE časově rychlejší a modernizovanější. Zatímco LLE nabízí známý postup pro rutinní zpracování v laboratoři. Při větší manipulaci se vzorkem při LLE může dojít ke ztrátám a chybovosti. Úprava vzorku pomocí MEPS poskytuje větší možnost automatizace, ale nižší citlivost na rozdíl od SPE. Časově je MEPS daleko rychlejší a zároveň i méně nákladnější. Extrakce se dá použít se stejným sorbentem i na několikrát. Výhody a nevýhody zmíněných metod úprav vzorků jsou shrnuty v tabulce 1 [29; 30; 31; 32; 33; 34].

Tabulka 1: Výhody a nevýhody SPE, LLE, DLLME, MEPS metod pro úpravu vzorku [29; 30; 31; 32; 33; 34]

Metoda	Výhody	Nevýhody
SPE	Vyšší čistota extraktu, vysoká přesnost	Vícekroková a časově náročná, vyšší spotřeba reagencií
LLE	Známý a rutinní laboratorní postup	Riziko ztrát vzorku, chybovost při manipulaci
DLLME	Rychlejší než LLE, moderní přístup	Vyžaduje přesnou manipulaci, vhodná jen pro některé analyty
MEPS	Rychlá, méně nákladná, možnost automatizace a opakované použití sorbentu	Omezená kapacita sorbentu a riziko zanesení systému

SPE úprava vzorku zahrnuje práci s většími objemy vzorku. Vzorky o objemu 2 ml se smíchají s 0,1 mol/l fosfátovým pufrem o pH 6,0. Upravený vzorek se smíchá s 20 µl vnitřního standardu (IS) o koncentraci 10 µg/ml. IS je složen z deuterovaných metabolitů nikotinu. Dále dochází ke kondiciování kolonky nejprve 3 ml metanolu, 3 ml destilované vody a 1 ml fosfátového pufru o pH 6. Vzorek je aplikován na SPE kolonku. SPE kolonka se promyje 3 ml destilované vody, 2 ml 0,2 mol/l kyseliny chlorovodíkové, 2 ml hexanu a 3 ml methanolu. Eluce je uskutečněna pomocí směsi 1 ml dichlormetanu, 2-propanolu a koncentrovaným hydroxidem amonným v poměru 78:20:2. Vzorek se odpaří dusíkem do scuha. Odparek se promíchá v 20 µl etylacetátu a 20 µl (BSTFA) s 1% trimethylchlorosilanem (TMS) a nechá se derivatizovat po 30 minut o teplotě 70 °C. Do přístroje je aplikován vzorek o objemu 1 µl [29].

Použitím LLE se do zkumavky napipetuje 1 ml vzorku. Postup extrakce je popsán ve studii od Man a spol. [30]. Po přidání 175 µl IS (difenylamin), 50 µl 0,1 mol/l hydroxidu sodného a 325 µl chloroformu se výsledný roztok promíchá na vortexu při 1500 otáčkách za minutu. Vzorek je připraven pro následnou centrifugaci po 4 minuty při 2500 otáčkách za minutu. Vzniklá vodná vrstva se odstraní. Do zbylého organického roztoku se přidá zhruba 0,1 g bezvodého síranu sodného a nechá se promíchat. Po ponechání roztoku 1 minutu odstát stačí jen převést vše do nádobky a umístit do autosampleru pro samotnou analýzu GC-MS. Ve studii od Kim a spol. [31] byl použit totožný postup bez přidání síranu sodného.

DLLME byla provedena se vzorkem o objemu 5 ml. Nejprve se pomocí hydroxidu sodného upraví pH na 9,0 a přidáním chloridu sodného se zvýšila iontová síla. 100 µl chloroformu obsahujícího IS (chinolon) se smíchá s 1 ml disperzního činidla (aceton). Pro nastání emulgace a dispergace se tento roztok vpraví do vzorku moči. Dále se roztok nechá zcentrifugovat 5 minut při 4000 otáčkách za minutu. Pro analýzu je použit organický vzorek o objemu 1 µl [32].

V neposlední řadě se vzorek moči dá upravit i pomocí MEPS. Tato technika je založena na přímém vložení sorbentu do dávkovací stříkačky či kazety. Jedná se o zminiaturizovanou verzi SPE. Jako sorbent se používá oktyl navázaný na oxid křemičitý o velikosti částic 45 µm a velikosti pórů 60 Å. Pro aktivaci sorbentu ve stříkačce lze použít 250 µl metanolu. Před prvním použitím je zapotřebí kondiciování sorbentu ve stříkačce buď 50 µl metanolu a 50 µl destilované vody, což provedli ve studii Lafay a spol. [33] nebo jen 250 µl destilované vody dle studie Iwai a spol. [34]. Iwai a spol. [34] nechali vzorek o objemu 500 µl společně se směsí 250 ng IS ve 200 µl hydroxidu sodného zcentrifugovat 5 minut při 2000 otáčkách za minutu. Pro odstranění rušivých elementů dojde k propláchnutí tuhé fáze destilovanou vodou. Následně probíhá eluce 30 µl metanolu. Lafay a spol. [33] po kondiciování sorbentu nechali stříkačku propláchnout vodou a hexanem. Po naplnění vzorku s IS (lepidin) do stříkačky byl použit acetonitril (ACN) pro desorbování stanovované látky. Pro pročištění byla stříkačka opět propláchnuta metanolem a vodou.

3.1.1.2 Analýza pomocí SPE-GC-MS

Dle studie od Chiadmi a spol. [29] byl použit chromatograf s hmotnostním spektrometrem Thermo Focus DSQ II od Thermo Quest s nepolární kapilární kolonou Uptibond® UB5 premium (HP-5MS) o rozměrech 0,25 mm x 30 m x 0,25 µm (tloušťka filmu 5% fenyl-methylpolysiloxanu). Jako nosný plyn bylo zvoleno helium o průtoku 1,2 ml/min. Teplotní program systému byl nastaven zpočátku ze 70 °C na 190 °C rychlostí 30 °C/min, dále na 230 °C za 5 °C/min a na finální teplotu 290 °C za 25 °C/min. Nástřikový prostor byl udržován při teplotě 250°C, kde byl dávkován vzorek o objemu 1µl. Celý systém pracoval na základě elektronové ionizace (EI) s využitím monitorování vybraných iontů (SIM). Analýza proběhla během 15 minut. První látkou v pořadí byl standard kotinin-d3, kotinin (COT), standard trans-3-hydroxykotinin-d3 a trans-3-hydroxykotinin (OH-COT). Nikotin v této studii bohužel nebyl analyzován. Pro analýzu vyjma vzorku a dvou IS bylo připraveno ještě osm kalibračních roztoků a tři kontrolní roztoky. Kalibrační roztoky COT a OH-COT byly o koncentracích 25-6000 ng/ml. Pět slepých vzorků bylo upraveno přidáním 0,2; 0,5 a 10 µg/ml kofeinu, ibuprofenu, metadonu, morfia, pseudoefedrinu, kodeinu, kokainu, klomipraminu, propanololu a Δ-9-tetrahydrokanabinolu pro ověření vlivu možných interferujících látek. Všechny roztoky byly předem uloženy v chladu při −20 °C.

3.1.1.3 Analýza pomocí LLE-GC-MS

Analýza byla provedena dle studie od Man a spol. [30] na chromatografu HP 6890 od Thermo Quest s hmotnostním detektorem HP 5973 Thermo Quest. Téměř stejnou experimentální studii provedli i Kim a spol. [31]. Použitou kapilární kolonou byla opět kolona HP-5MS se stejnými rozměry z taveného křemíku (0,25 mm x 30 m; 0,25 μm). Kim a spol. použili přístroj GC2010 od Shimadzu. Teplota termostatu byla nastavena na regulaci od 70 °C do 230 °C při 40 °C/min. Teplotní program ve studii Man a spol. [30] byl nastaven od 70 °C do 230 °C rychlostí 25 °C/min. Nástřikový prostor měl teplotu 250 °C. Systém pracoval na základě režimu SIM. Pro analýzu byly použity i vzorky s nedetekovatelným nikotinem a kotininem, které sloužily jako kontrolní vzorky. Kalibrační řada o osmi kalibrátorech sestávala z koncentrací 0,5-5000 ng/ml. V metanolu byl připraven i IS – 250 ng/ml difenylaminu. Všechny roztoky byly předem uloženy při teplotě −20 °C.

3.1.1.4 Analýza pomocí DLLME-GC-MS

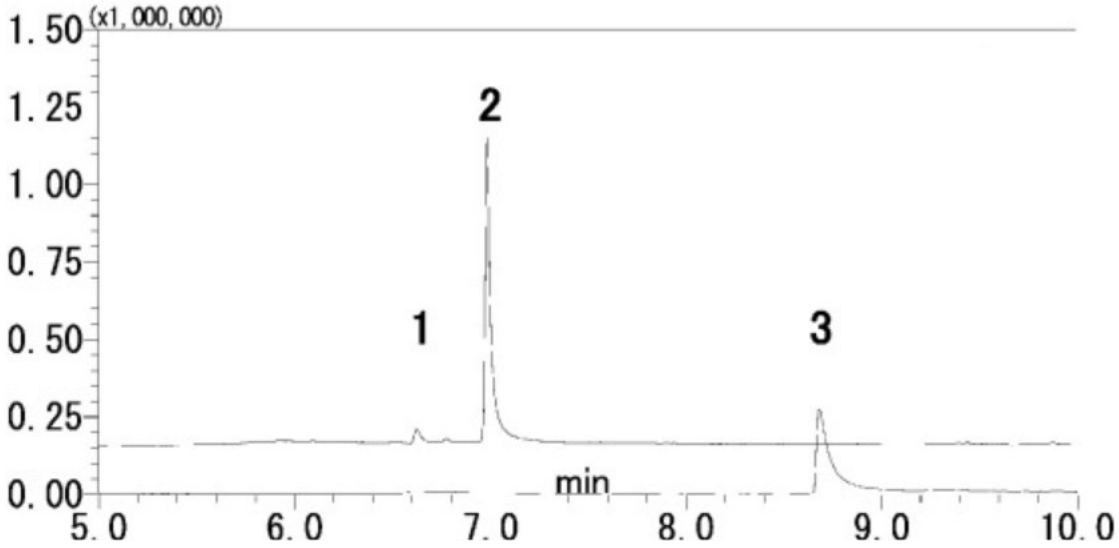
Chromatograf 6890 N Agilent Technologies s hmotnostním spektrometrem 5973 Agilent Technologies byly použity ve studii dle Li a spol. [32]. Zvolená kapilární kolona DB-5MS je identická s kolonou HP-5MS s předchozích studií. Práce se nelišila od ostatních analýz, rozdíl spočíval v teplotním programu. Počáteční program byl nastaven na 80 °C po dobu 2 minut, dále zvyšování na 200 °C o 10 °C/min a drženo 1 minutu. Od 200 °C došlo k navýšení na 280 °C při rychlosti 25 °C/min, drženo 3 minuty. Nástřikový prostor byl udržován na teplotu 250 °C. IS se skládal z 2-metylpyrazinu. Standardy měly koncentrace od 10-5000 ng/ml pro nikotin i kotinin, jenž byly připraveny ředěním IS roztoků vodou a přidávány do čisté moči.

3.1.1.5 Analýza pomocí MEPS-GC-MS

Dle studie Iwai a spol. [34] byl pro analýzu použit přístroj GC-2010 Plus Shimadzu s kapilární kolonou DB-5MS (0,25 mm x 30 m; 0,25 μm) od Agilent Technologies. Práce probíhala v režimu EI s využitím SIM. Rozdíl s metodou od Lafay a spol. [33] opět spočíval na základě teplotního systému. Teplota nástřikového prostoru se držela na 290 °C. Teplotní program začínal na 50 °C, po jedné minutě došlo ke stoupání teploty na 200 °C rychlostí 15 °C/min. Z teploty 200 °C na 300 °C už byla rychlost nižší o 5 °C/min. Standardy pro nikotin byly připraveny v koncentračním rozmezí od 1-100 ng/ml a pro kotinin 50-1000 ng/ml. Pro celkovou analýzu byly nachystány i kontrolní vzorky nikotinu a kotininu. Ve studii od Lafay a spol. [33] použili přístroj i kolonu stejnou jako v kapitole 3.1.1.4. Teplotní program byl nastaven na 80 °C do 325 °C rychlostí 30 °C/min, 1 minutu podrženo. Z 325 °C na 350 °C byla rychlost stejná.

3.1.1.6 Výsledky GC-MS analýz a srovnání

Ze studie Iwai a spol. [34] je na obrázku 4 vzorový chromatogram vzorku moči. Vzorek moči byl odebrán 1 hodinu po vykouření jedné cigarety a během 24 hodin byl zanalyzován pomocí MEPS-GC-MS. Výsledné koncentrace nikotinu a kotininu v moči byly 1,56 ng/ml a 1,07 μg/ml.



Obrázek 4: Ukázkový chromatogram vzorku moči s píky nikotinu (1), IS (2) a kotininu (3) [34]

Pro velmi nízké koncentrace a hodnoty je nejvhodnější metoda SPE-GC-MS, na základě nejnižších hodnot limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ). Metoda SPE-GC-MS bude i metodou nejpřesnější a nejreprodukovatelnější z ostatních zmíněných porovnáním hodnot výtěžnosti. Avšak z hlediska výtěžnosti lze velmi dobře hodnotit i metodu MEPS-GC-MS. Tato metoda bude i časově nejefektivnější a s nejmenší spotřebou rozpouštědel i ekologicky nejšetrnější. Dle směrodatné odchylky (RSD) se pro validaci dá použít zejména metoda SPE-GC-MS a MEPS-GC-MS, ostatní metody jsou vhodnější spíše pro rutinní screening. Vše zmíněné je znázorněno v tabulce 2 [29; 30; 31; 32; 33; 34].

Tabulka 2: Srovnání GC-MS analýz na základě rozdílné úpravy vzorku [29; 30; 31; 32; 33; 34]

Metoda	**LOD (ng/ml)**	**LOQ (ng/ml)**	**Výtěžnost (%)**	**RSD**
SPE-GC-MS	kotinin: 0,1	kotinin: 0,3	95-105	<5 %
LLE-GC-MS	nikotin: 2 kotinin: 1	nikotin: 5; kotinin: 2,5	nikotin: 85-95 kotinin: 90-102	2-8 %
DLLME-GC-MS	nikotin: 1,5 kotinin: 1,2	nikotin: 5; kotinin: 4	82-98	<6 %
MEPS-GC-MS	nikotin: 1,0 kotinin: 0,5	nikotin: 3,0; kotinin: 1,5	90-110	<4 %

3.1.2 Stanovení pomocí plynové chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem

Za zmínku stojí i studie zabývající se metodou GC-NPD. Příprava vzorku je na základě LLE s IS lidokainem. Odpaření proběhlo pomocí dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 50 µl isopropylalkoholu. Pro analýzu byl použit roztok o objemu 1 µl. Dle studie Malafatti a spol. [35] byl použit chromatograf Clarus 400 s NPD od Perkin Elmer® se softwarem od Totalchrom Workstation®. Kapilární kolonou byla ZB-1 Phenomenex® se stacionární fází 100 % polydimethylsiloxanu (30 m x 0,53 mm; 5 µm). Dusík byl zvolen jako nosný plyn s tlakem 4,3 PSI. Nástřikový prostor byl nastaven na teplotu 260 °C. Teplotní program začínal od teploty 180 °C na 250 °C při rychlosti 30 °C/min za půl minuty, pokračoval na 259 °C při 15 °C/min za 0,1 minuty a při rychlosti 0,1 °C/min se zastavil na 260 °C. Celková analýza trvala 13,4 minuty. Stanovovaným analytem byl pouze kotinin. LOQ bylo stanoveno na 10 ng/ml. RSD se pohybovala od 2,1 % do 14,2 %. Z hlediska výtěžnosti, která sestávala v rozmezí od 88,5 % do 108,2 % se dá mluvit o dobré přesnosti a reprodukovatelnosti. Další parametry nebyly vyhodnoceny.

V porovnání s GC-MS při různých úpravách vzorků je metoda GC-NPD citlivá pro stanovování velmi nízkých koncentrací. RSD spadala pod 15 %, metoda se dá považovat za přesnou, avšak s technikami GC-MS ze zmiňovaných studií z kapitoly 3.1.1 a hodnocených parametrů se tato metoda nemůže srovnávat [35].

3.1.3 Stanovení pomocí kapalinové chromatografie

Hlavním rozdílem mezi plynovou a kapalinovou chromatografií (LC) je použitá mobilní fáze. Mobilní fází u LC je kapalina, zatímco stacionární fáze je pevná látka umístěna v koloně. U HPLC se využívá kolona kapilární. Při vzájemné interakci obou fází dojde opět k separaci na základě odlišných chemických a fyzikálních vlastností. Jedná se zejména o polaritu. Podle toho, zda je stacionární fáze či mobilní fáze polárnější než druhá, rozlišujeme systém obrácených fází a systém normálních fází. Technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která spočívá ve využití vysokotlakých čerpadel a užšího průměru kolony, poskytuje vyšší rychlost a rozlišení. Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) probíhá ještě rychleji, částice použité stacionární fáze jsou totiž mnohem menší. Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se používá pro separaci polárních látek rozpustných ve vodě [36; 37].

3.1.3.1 Úprava vzorku

Obdobně jako u GC, při LC se vzorky dají upravit pomocí SPE nebo LLE. LLE v této době není pro LC už tak využívána. U některých metod se využívá úpravy srážením bílkovin, biologickým vzorkem bývá spíše plazma než moč. Další metody jsou založeny například na technice Dilute-and-shoot, která spočívá v pouhém naředění vzorku a přímé injekce. K ochraně kolony slouží filtrace přes membránu. Před analýzou je důležité rekonstituovat vzorek v mobilní fázi či vhodném rozpouštědle [38].

Při práci s SPE technikou v následujících studiích Piller a spol. [39], Scheidweiler a spol. [40], Paci a spol. [41], Miller a spol. [42] se využívají deuterované roztoky nikotinu a kotininu jako IS. Vzorky moči o objemu 50 µl s vysokou koncentrací analytů až po vzorky o objemu 30 ml pasivních kuřáků se smíchají s 10-50 µl IS. Během přípravy dochází ke kondiciování kolony 2-3 ml metanolu, vody a mravenčanem amonným dle Pillera a spol. [39] nebo fosforečnanem sodným Scheidweiler a spol. [40]. Mravenčan amonný byl buď 5 mmol/l či 20 mmol/l s pH 2,5 a 0,1 mmol/l fosforečnan sodný s pH 6. Následně se vzorky nanesou na SPE kolonku a dochází k promývání kolonky. Promývání se dá provést opět mravenčanem amonným nebo postupně vodou, kyselinou chlorovodíkovou a metanolem. Poté probíhá eluce cílových analytů 1 ml směsi metanolu a vodného hydroxidu amonného, jak je popsáno ve studii od Pillera a spol. [39] nebo ve studii Millera a spol. [42]. Scheidweiler a spol. [40] eluci provedli směsí 5 ml dichlormetanu, isopropanolu a hydroxidu amonného. Ještě před odpařením se přidá 100 µl 1% kyseliny chlorovodíkové v metanolu. Odpaření probíhá proudem dusíku při 40 °C pomocí odparky na zhruba 5-10 µl z celkového objemu pro zabránění ztrát. Pro rozpuštění odpařeného vzorku se používá 100-200 µl vhodného rozpouštědla či mobilní fáze: metanol smíchaný s vodou, 0,1% kyselina mravenčí nebo jen destilovaná voda. Po eluci lze ještě provést filtraci na membránových filtrech. Vzorek v desítkách mikrolitrů je takto připraven pro analýzu.

Pro LLE metodu je dle studií Marclay a spol. [43] a Pérez-Ortuño a spol. [44] používaný IS opět složen z deuterovaných roztoků nikotinu a kotininu nebo se podle Petersen a spol. [45] používá 2-fenylimidazol rozpuštěný ve vodě. Vzorky moči od 500 µl až do 2 ml jsou smíchány s roztokem IS a případně dochází k úpravě pH alkalizací hydroxidem sodným či přidáním fosfátového pufru o pH 7. Používaným extrakčním činidlem byl ve studii Petersen a spol. [45] i podle Pérez-Ortuño a spol. [44] dichlormetan a ve studii Marclay a spol. [43] byla použita směs chloroformu s 2-propanolem. Po extrakci může následovat už jen odpaření vzorku a jeho rekonstituce v mobilní fázi nebo lze pokračovat ještě centrifugací. Odstřeďování probíhá 10 minut při 3400 otáčkách za minutu nebo po kratší dobu 5 minut při 2500 otáčkách za minutu. Při mírném proudu vzduchu dochází k odpaření organické části roztoku. Zbylý objem vzorku je rozpuštěn v mravenčanu amonném. Během extrakce se využívá příslušná rotační jednotka.

Úpravu vzorku bílkovinnou precipitací provedli Oh a spol. [46] roztokem ACN. Sharma a spol. [47] použili jako činidlo roztok acetonu následovaným 0,1% kyselinou mravenčí v metanolu. V případě precipitace ACN se dle Oh a spol. [46] k vzorku o objemu 30 µl přidá 90 µl ACN s IS obsahující deuterované roztoky nikotinu a kotininu. Následuje centrifugace po 10 minut při 15000 otáčkách za minutu. K odebranému supernatantu se přidá 120 µl destilované vody. Při precipitaci acetonem podle Sharma a spol. [47] nejprve dochází k centrifugaci za chladu po dobu 5 minut při 10000 otáčkách za minutu. Ke 100 µl vzorku moči je přidáno 100 µl acetonu a celý roztok je promíchán na vortexu. Po přidání 0,1% kyseliny mravenčí se vzorky inkubují zakryté 5 minut opět v chladu (5 °C). Druhá centrifugace probíhá 5 minut za stejných podmínek. Roztok je přefiltrován přes membránu o velikosti pórů 0,45 µm s průměrem 4 mm.

Celková úprava vzorku může spočívat pouze v centrifugaci a filtraci, jak popisují studie od Shaik a spol. [48], Li a spol. [49] a Meger a spol. [50]. Při využití pouhé centrifugace podle Shaik a spol. [48] se vzorky moči o objemu 2 ml odstředí při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a jsou připraveny pro analýzu. V případě studie Meger a spol. [50] je vzorek moči smíchán s IS, jenž je složen z roztoku deuterovaného nikotinu a kotininu, zředěn destilovanou vodou a promíchán na vortexu. Následně může být vzorek odstředěn po dobu 15 minut 13360 otáčkách za minutu. Odstředěný vzorek je přefiltrován přes filtrační membránu. Bez využití centrifugace upravili vzorek Li a spol. [49] a už po smíchání s IS byl vzorek přefiltrován skrz 0,22 µm polyethersulfonovou mikroporézní filtrační membránu.

Mezi speciální úpravy vzorku patří enzymatická hydrolýza, kterou popsali Mcguffey a spol. [51] a on-line SPE ze studie Chen a spol. [52]. Při úpravě vzorku pomocí enzymatické hydrolýzy se rozlišuje volná a konjugovaná forma nikotinu a kotininu. N-beta-(S)-nikotin glukuronid a kotinin N-glukuronid jsou konjugované formy nikotinu a kotininu. Enzym β-glukuronidáza štěpí glukuronidové vazby v těchto konjugovaných vazbách. Enzymatickou hydrolýzou s použitím enzymu β-glukuronidáza lze tedy stanovit množství vázaného a volného nikotinu a kotininu. Pro úpravu celkového vzorku se smíchá IS se vzorkem, vodou a roztokem enzymu. Po inkubaci při 37 °C 21 hodin se provede proteinová precipitace se srážecím činidlem acetonem a výsledný roztok je promíchán. Při chladničkové teplotě se vzorek nechá odstát alespoň 10 minut. Dále je provedena centrifugace v chladu pro odstranění precipitátu po dobu 30 minut při 3200 otáčkách za minutu. Vrchní část roztoku je odebrána a smíchána s kyselinou chlorovodíkovou a metanolem. Pro odstranění acetonu se provádí sušení po dobu 30 minut v odparce. Úprava vzorku pro stanovení volné formy spočívá v přidání IS k vzorku moči a enzymatický roztok je nahrazen vodou. Následně dochází k proteinové precipitaci acetonem s obdobnými kroky pro stanovení celkového množství látek. U on-line SPE techniky je extrakční kolona součástí LC systému. Vzorek moči o objemu 20 µl je smíchán s metanolem a 0,1% kyselinou mravenčí. Roztok vzorku se promíchá na vortexu a poté se k roztoku přidá IS. Výsledný roztok je pomocí autosampleru nasán do systému. Mobilní fáze složena z 5% metanolu a 0,1% kyseliny mravenčí promyje extrakční kolonu, kde dochází k odstranění interferujících látek. Po přepnutí ventilu stanovované látky eluují směrem na LC kolonu.

Pro úpravu vzorku moči byla ve zmiňovaných studiích z kapitoly 3.1.3.1 nejvíce využívána SPE metoda. Ta je i přes svoji vysokou přesnost, stejně jako u stanovení pomocí GC, spíše časově náročnější. Technika LLE je starší metodou, cenově dostupnější, avšak méně přesnější a citlivější. Mezi rychlé techniky patří proteinová precipitace a úprava vzorku jen pomocí centrifugace a filtrace. Úprava vzorku pomocí enzymatické hydrolýzy je časově náročnější. On-line SPE technika je vysoce modernizovaná metoda s možností efektivní automatizace. Vyžaduje však nákladné vybavení. Shrnutí výhod a nevýhod těchto metod lze najít v tabulce 3 [39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52]

Tabulka 3: Výhody a nevýhody SPE, LLE, proteinové precipitace, centrifugace + filtrace, enzymatické hydrolýzy a on-line SPE metod pro úpravu vzorku [39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 49; 50; 51; 52]

Metoda	Výhody	Nevýhody
SPE	Vysoká selektivita a čistota vzorku, možnost volby pH, dobrá opakovatelnost	Delší časová náročnost, vyšší cena (kolony, činidla), nutnost více kroků
LLE	Levná a dostupná rozpouštědla, rychlá aplikace	Použití toxických rozpouštědel
Proteinová precipitace	Rychlá a jednoduchá, minimální objem vzorku i činidel	Možné zbytky matrice
Centrifugace + filtrace	Velmi jednoduchá a rychlá, vhodná pro screening	Vysoký matricový efekt, nevhodná pro stopová množství
Enzymatická hydrolýza	Stanovení volných i konjugovaných forem, přesné vyhodnocení expozice	Dlouhá inkubace, nutnost enzymu a specifických podmínek
On-line SPE	Automatizace, nižší riziko kontaminace	Vysoké pořizovací náklady, vyšší technická náročnost

3.1.3.2 Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Důležitou metodou pro stanovení nikotinu a kotininu v moči je vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS). Identifikace a kvantifikace probíhá na základě rozdílné efektivní hmotnosti (m/z) stanovovaných látek s využitím tandemových hmotnostních spektrometrů. Nejčastěji se jedná o systém trojitý kvadrupól (QqQ). QqQ pracuje na základě čtyř kvadrupólových elektrod (Q), které urychlují ionty ve spojení s kolizní komorou (q), která umožňuje srážení iontů a z nich vznik menších fragmentovaných iontů. Identifikace cílových analytů v HPLC-MS/MS je založena na tzv. MRM přechodech, specifických m/z hodnot pro vybraný iont, ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem typu QqQ [53].

Analýza dle studie od Oh a spol. [46] byla provedena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem Waters XEVO TQ-S od Waters Corporation se spojeným systémem kapalinové chromatografie Acquity UPLC také od Waters Corporation. Zvolenou kolonou byla Kinetex EVO C18 od Phenomenex (2,1 mm × 150 mm; 5 μm) s gradientovou elucí mobilních fází: A (30 mmol/l hydrogenuhličitan amonný s pH ~8,5) a B (ACN) při průtoku 0,4 ml/min. První 1,6 minuty byl průtok mobilní fáze A na 91 %, během 0,1 minuty přešel na 85 %. Po 3 minutách byl znovu vyrovnán na 91 %, takto zůstal nastaven do 6,5 minuty. Ionizace probíhala v režimu pozitivní elektrosprejové ionizace (ESI) a MRM. Pro každý analyt byl použit optimalizovaný přechod m/z, kvantifikace probíhala na základě poměru signálu analytu k internímu standardu. Přechod m/z pro nikotin byl 163,2 na 132,2 pro kvalitu, na 84,2 na kvantitu a deuterovaný nikotin s m/z 167,3 na 134,2 pro kvantitu. Pro kotinin m/z 177,2 na 146,1 pro kvalitu, na 98,1 pro kvantitu a deuterovaný kotinin s m/z 180,2 na 101,1 pro kvantitu.

Studie podle McGuffey a spol. [51] byla provedena na systému HPLC Shimadzu a tandemovém hmotnostním spektrometru AB Sciex API 4000 (Framingham). Separace probíhala opět gradientovou elucí na koloně Phenomenex Gemini-NX C18 (4,6 mm x 150 mm; 5 μm) s mobilní fází A (6,5 mmol/l uhličitan amonný s pH 10,5) a B (ACN) při průtoku 1,0 ml/min. Během 1 minuty byla fáze B nastavena na 3 % průtok, od 9 do 10,5 minuty na 30 %, dále do 11,2 minuty na 100 %. Od 11,2 do 13,5 minuty byl průtok mobilní fáze B nastaven zpět na 3 %. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Detekce probíhala v pozitivním režimu ESI s využitím MRM přechodů. Přechod m/z pro nikotin byl z 163 na 117 pro kvalitu a na 130 pro kvantitu, pro deuterovaný nikotin byl zvolen přechod pro kvalitu 166 na 130. Pro kotinin byl přechod 177 na 98 pro kvalitu a 80 pro kvantitu a pro deuterovaný kotinin ze 180 na 80 pro kvalitu.

I studie podle Scheidweiler a spol. [40] probíhala na základě gradientové eluce: mobilní fáze A (0,1% kyselina mravenčí ve vodě) a B (0,1% kyselina mravenčí v ACN) při průtoku 0,25 ml/min. První 3 minuty byla fáze B z 5 % nastavena na 50 % a tak byla udržena 2 minuty. Za 1 minutu se fáze B opět snížila na 5 % a zůstala na 5 % 2 minuty do konce analýzy. Pro analýzu byl použit přístroj HPLC Shimadzu se spektrometrem ABSciex API 3200 QTrap®. Zvolenou kolonou byla Synergi Polar RP od Phenomenex (2,1 mm × 100 mm; 2,5 μm). Hmotnostní spektrometrie probíhala v pozitivním režimu ESI s MRM přechody specifickými pro nikotin a kotinin. Přechody m/z pro nikotin a jeho IS byly zvoleny stejně jako ve studii od Oh a spol. [46]. Pro kotinin byly zvoleny m/z hodnoty stejné jako u studie McGuffey a spol. [51].

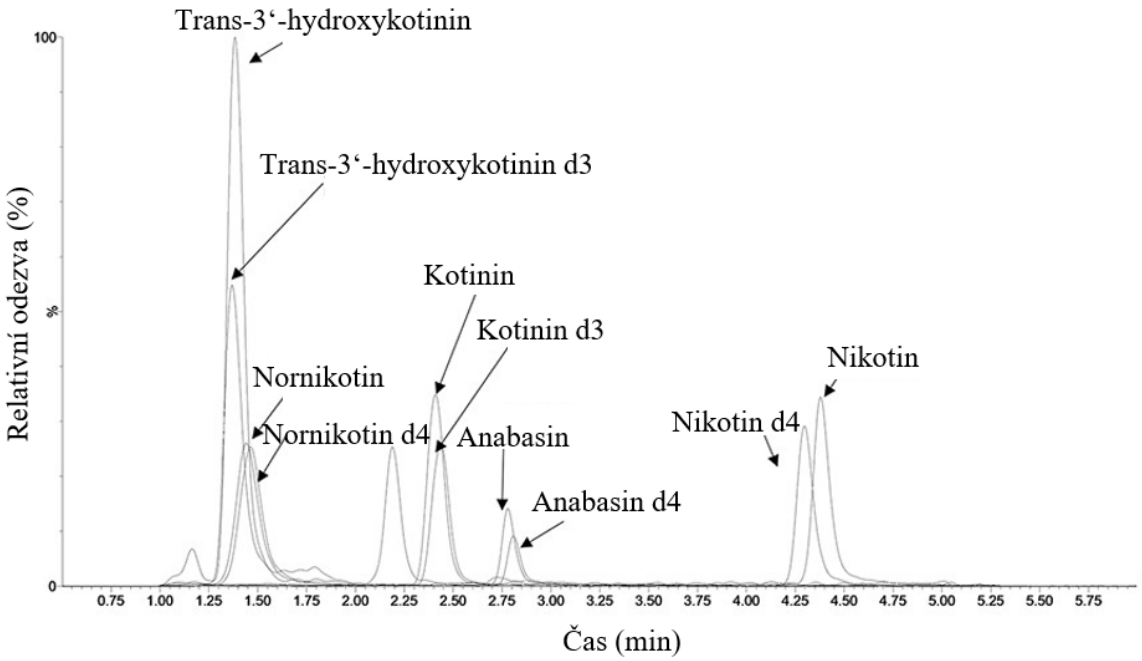
Pro HPLC-MS/MS ve studii Chen a spol. [52] byl použit přístroj 1200 series od Agilent Technologies ve spojení s trojitým kvadrupólem 6460 od Applied Biosystems. Zvolenou kolonou byla Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 mm × 100 mm; 3,5 μm). Mobilní fáze s průtokem 0,5 ml/min probíhala opět na základě gradientové eluce. Po dobu 5,5 minut byla mobilní fáze A (5% ACN a 0,1% kyselina mravenčí) na 100 %, po další 2,5 minuty byla na 100 % mobilní fáze B (95% ACN a 0,1% kyselina mravenčí). Během 0,1 minuty se fáze A vrátila opět na 100 % a zůstala tak až do konce analýzy. Režim probíhal v pozitivní ESI s MRM. Stanovován byl pouze kotinin. Hodnoty m/z byly stanoveny pro kotinin z 177 na 80 a pro jeho IS od 180 na 80.

Stanovení nikotinu a kotininu pomocí HPLC-MS/MS provedla i Miller a spol. [42]. Vybraným přístrojem pro analýzu byl Acquity UPLC® systém od Waters® s hmotnostním spektrometrem Quattro Premier XE™ od Waters®. Rozdíl spočíval zejména v použití kolony Discovery HS F5 (4,6 mm x 100 mm; 3 μm) s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Gradientová eluce byla nastavena zpočátku na 15 % mobilní fáze B (metanol), přičemž množství fáze B lineárně stoupalo na 76 % do 11 minut analýzy. Po půl minutě se fáze B vrátila opět na 15 % a zůstala tak nastavena do konce analýzy. Mobilní fáze A se skládala z 10 mmol/l octanu amonného s 0,001% kyselinou mravenčí. Analýza probíhala v pozitivním ESI režimu s MRM přechody. Pro nikotin byly m/z hodnoty 163,2 na 130, pro deuterovaný nikotin m/z 166,1 na 129,9. U kotininu byly zvoleny hodnoty m/z 177,2 na 79,9 a pro deuterovaný kotinin m/z 180,1 na 79,9.

Piller a spol. [39] pracovali při velmi podobných podmínkách. Přístroj AT 1100 system Agilent Technologies s hmotnostním spektrometrem API 4000 ABSciex pracoval v režimu pozitivní ESI a MRM. Kolona Luna C8 od Phenomenex (4,6 mm x 150 mm; 3µm) s průtokem mobilní fáze 0,7 µl/min. Gradientová eluce začínala na 95 % mobilní fáze A (0,1% octan amonný) po dobu 1 minuty s následným lineárním sestupem na 20 % do 6 minut analýzy. Po další 2 minuty byla na 100 % mobilní fáze B (metanol). Do konce analýzy se mobilní fáze A nastavila opět na 95 %. Hodnoty MRM přechodů pro nikotin byly zvoleny m/z 162,9 na 132 pro kvalitu a na 130 pro kvantitu. Pro deuterovaný nikotin byly hodnoty m/z 166 na 130,2. Kotinin měl hodnoty m/z 177,2 na 98 pro kvalitu, na 80,1 pro kvantitu a pro deuterovaný kotinin m/z 180,1 na 80.

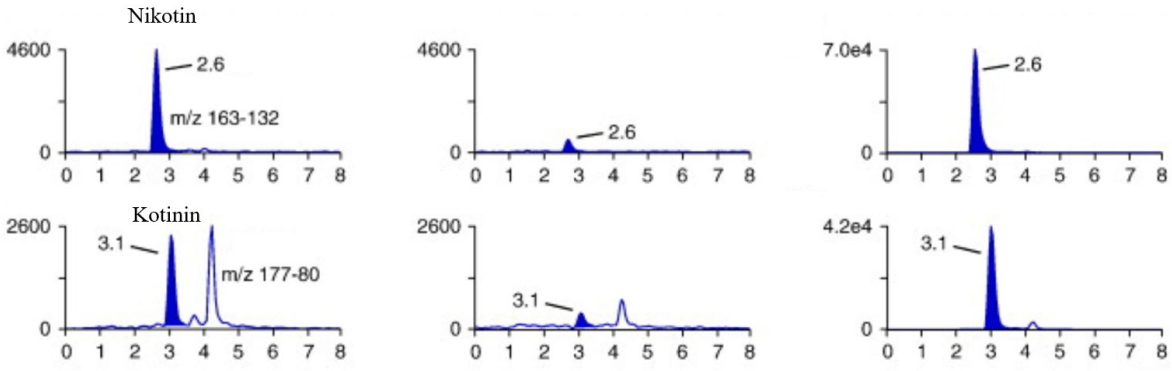
V isokratickém elučním módu pracovala Sharma a spol. [47] a Meger a spol. [50]. Sharma a spol. [47] pracovali na přístroji Agilent 1200 v sérii s trojitým kvadrupólem Agilent 6460 a s kolonou Polaris 3C-18 (3,0 × 150 mm; 5 µm). Zvolenou mobilní fází byla voda s ACN v poměru 80:20. V druhé studii podle Meger a spol. [50] probíhala analýza na HP 1100 LC systému Agilent Technologies a hmotnostním spektrometrem PE Sciex API 2000 se Synergy MAX RP kolonou (4,6 mm × 150 mm, 4 µm). Isokratický režim spočíval v použití mobilní fáze (10 mmol/l uhličitan amonný pH 6,8 a metanol v poměru 20:80) s průtokem 1 ml/min. Obě studie pracovaly v režimu pozitivní ESI s MRM přechody. Hodnoty m/z pro nikotin a kotinin se rovnaly hodnotám, které zvolili Miller a spol. [42] pro kvantitu.

Ve studii dle Oh a spol. [46] stanovovali nikotin a jeho metabolity. Na obrázku číslo 5 lze sledovat ukázkový chromatogram vzorku moči. Čisté vzorky moči byly obohaceny roztoky nikotinu, kotininu a jejich deuterovanými roztoky – IS. Pro identifikaci těchto látek v moči v neznámém vzorku pomocí HPLC-MS/MS může figurovat tento chromatogram jako porovnání se specifickými koncentracemi. Retenční čas nikotinu byl 4,4 minuty a kotininu 2,4 minuty. Správná volba MRM přechodu zvyšuje selektivitu, citlivost a reprodukovatelnost metody.



Obrázek 5: Ukázkový chromatogram nikotinu, trans-3'-hydroxykotininu, kotininu, nornikotinu, anabasinu a jejich IS ve vzorku moči s koncentracemi 20 ng/ml pro nikotin, 50 ng/ml pro kotinin, 100 ng/ml pro trans-3'-hydroxykotinin, 20 ng/ml pro nornikotin a 5 ng/ml pro anabasin [46]

Ve studii od Scheidweiler a spol. [40] byly zkoumány vzorky moči abstinentů. Jedna skupina respondentů byla bez expozice kouření a druhá skupina podléhala pasivnímu kouření. Na obrázku 6 jsou znázorněny tři MRM chromatogramy vzorků moči pro nikotin, a i pro kotinin. První chromatogram je ze vzorku moči s přidaným příslušným analytem v množství LOD. Na druhém jsou vzorky moči abstinentů bez expozice a na třetím vzorky pasivních kuřáků. Bohužel, ani hodnoty pasivních kuřáků nedosahovaly vyšších hodnot než LOQ, provedení kvantifikace tedy nebylo možné.



Obrázek 6: MRM chromatogramy vzorků moči nikotinu a kotininu obohacených o hodnoty LOD (vlevo), abstinentů bez expozice (uprostřed) a pasivních kuřáků (vpravo) [40]

Všechny metody ve zmíněných studiích HPLC-MS/MS využily MRM režim. S velmi podobnými podmínkami docházelo k rozlišení mezi studiemi zejména v eluci, a to, jestli se jednalo o gradientovou či izokratickou. Necitlivější metodu pro stanovení nikotinu a kotininu v moči vykazuje podle hodnot LOD a LOQ ze studie Chen a spol. [52] HPLC-MS/MS s on-line SPE úpravou vzorku. V této studii byl ale stanovován pouze kotinin. On-line SPE úprava vzorku je také cenově vyšší a technicky náročnější metodou. Za další velmi citlivé metody lze pokládat studie od Megera a spol. [50], Oha a spol. [46] a Scheidweilera a spol. [40]. Mezi rychlé analýzy lze zařadit HPLC-MS/MS dle Megera a spol. [50] či HPLC-MS/MS od Oha a spol. [46] a Sharmy a spol. [47]. Při srovnání všech stanovených hodnot analýza HPLC-MS/MS od Oha a spol. [46] patří mezi nejlepší mezi vybranými studiemi v rámci rychlosti analýzy a úpravy vzorku, citlivosti, přesnosti a výtěžnosti. Shrnutí LOD, LOQ, výtěžnosti, RSD a úpravy vzorku je znázorněno v tabulce 4.

Tabulka 4: Souhrn stanovovaných analytů, hodnoty LOD a LOQ, výtěžnost, RSD a způsob úpravy vzorku pro LC-MS/MS analýzy z předešlých studií [39; 40; 42; 46; 47; 50; 51; 52]

Studie	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Výtěžnost (%)	RSD (%)	Úprava vzorku
Piller a spol. [39]	nikotin: 0,5 kotinin: 0,17	nikotin: 1,5 kotinin: 0,51	>80	nezmíněno	SPE
Scheidweiler a spol. [40]	nikotin: 0,5 kotinin: 0,1	nikotin: 1 kotinin: 0,2	82.0–118.7	3,0-9,1	SPE
Miller a spol. [42]	1	2,5	87-118	1,5-4,7	SPE
Oh a spol. [46]	nikotin: 0,2 kotinin: 0,5	nikotin: 1,0 kotinin: 2,0	87-109	−10.1-5.3	proteinová precipitace
Sharma a spol. [47]	kotinin: 0,5	kotinin: 1,1	100,26	nezmíněno	proteinová precipitace
Meger a spol. [50]	0,06	nezmíněno	92-109	nezmíněno	centrifugace, filtrace
McGuffey a spol. [51]	nikotin: 1,63 (celkový: 1,55) kotinin: 1,4 (celkový: 3,53)	nezmíněno	76-99	0-10	enzymatická hydrolýza
Chen a spol. [52]	0,005	0,02	nezmíněno	nezmíněno	on-line SPE

3.1.3.3 Stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detektorem

Ve studii dle Petersen a spol. [45] i dle Shaik a spol. [48] proběhla analýza HPLC s využitím UV/VIS detektoru na reverzních fázích. Petersen a spol. použili přístroj od firmy Agilent technologies s RP kolonou C8 (4,6 mm x 150 mm; 5 μm), která byla chráněna předkolonkou XDB C8 (12,5 mm x 4,6 mm; 5 μm) s rychlostí průtoku 0,5 ml/min. Mobilní fáze byla složena z ultra čisté vody, metanolu a 0,1 mol/l octanu sodného a ACN s poměrem 50:15:25:10, přičemž ke každému litru mobilní fáze byl přidán 1 ml 34 mmol/l kyseliny citronové a 5 ml triethylaminu. Pro úpravu pH na hodnotu 4,4 byla použita ledová kyselina octová. Vlnová délka pro stanovení byla zvolena jako 261 nm. Shaik a spol. [48] pracovali s HPLC systémem od Shimadzu s UV/VIS detektorem SPD-20A a kolonou C18 (5 μm). Průměr a délka kolony nebyly v práci upřesněny. Mobilní fáze byla složena z 0,272 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,184 g n-heptansulfonátu sodného, 820 ml vody a 180 ml metanolu s rychlostí průtoku 1 ml/min. Úprava pH mobilní fáze byla provedena pomocí kyseliny ortofosforečné na hodnotu 3,2. Zvolená vlnová délka pro nikotin byla 256 nm a pro kotinin 262 nm. Petersen a spol. [45] pracovali na základě gradientové eluce a Shaik a spol. [48] izokratické eluce. Celkový čas analýzy byl tedy kratší v případě gradientové eluce.

Studie od Petersen a spol. [45] provedla HPLC-UV/VIS analýzu s gradientové elucí a úpravou vzorku pomocí LLE. Shaik a spol. [48] analýzu HPLC-UV/VIS s izokratickou elucí a upravili vzorek pouze centrifugací. Petersen a spol. [45] ve své práci stanovovali pouze kotinin. Hodnota LOD byla 0,18 ng/ml a LOQ 5 ng/ml. RSD se pohybovala od 1,3 do 5,5 %. Výtěžnost dosahovala hodnot 92-100,2 %. Jedná se tedy o citlivou a přesnou metodu pro stanovení kotininu v moči s využitím UV/VIS detektoru.

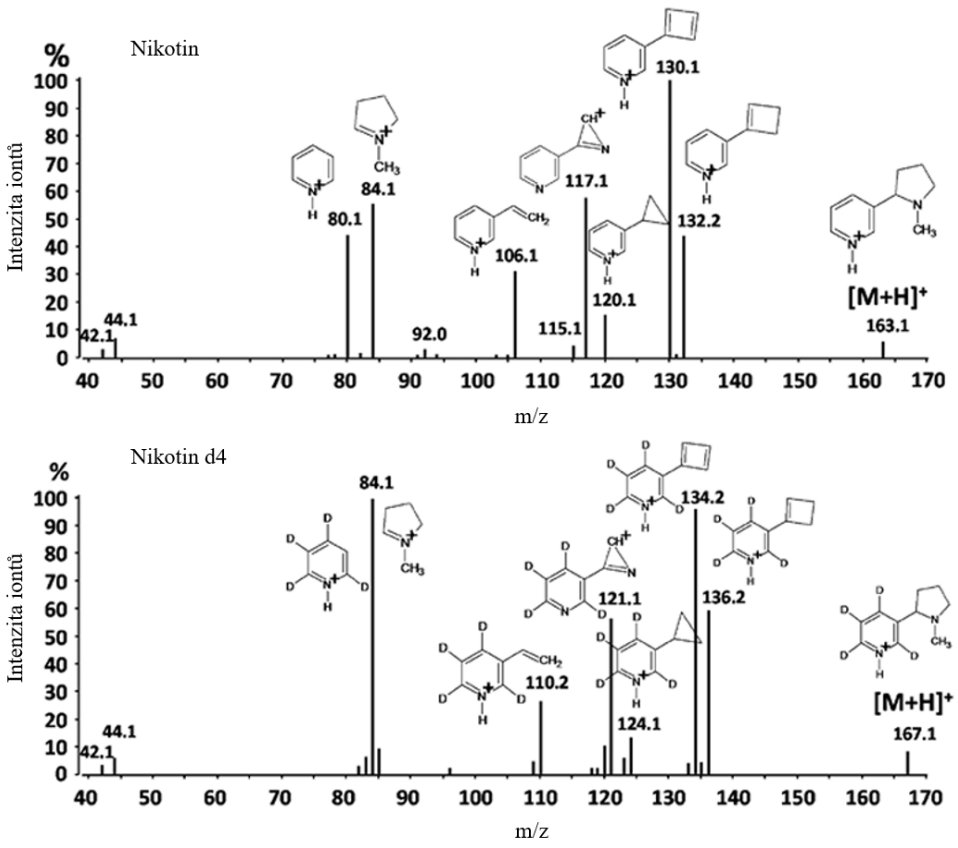
3.1.3.4 Stanovení pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem

Li a spol. [49] provedli ve studii analýzu HILIC s LC systémem Nexera X2 od Shimadzu a tandemovým hmotnostním spektrometrem TSQ Vantage trojitý kvadrupól od Thermo Fisher s ionizací ESI v pozitivním módu. Zvolenou kolonou pro analýzu byla ACQUITY UPLC BEH HILIC od Waters Corporation (30 mm x 50 mm; 17 μm). Mobilní fáze se skládala z metanolu a 0,1% amoniaku v poměru 60:40. Jednalo se o izokratický typ eluce při průtoku 0,2 ml/min.

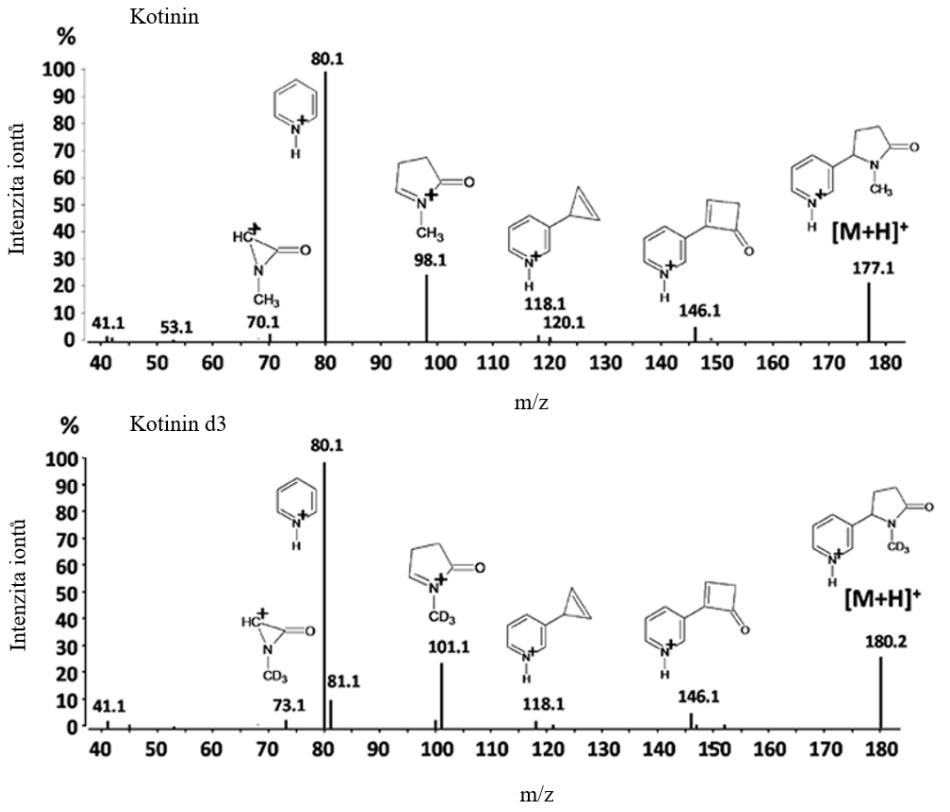
I ve studii od Marclay a spol. [43] a Pérez-Ortuño a spol. [44] byla provedena HILIC analýza ve spojení s MS/MS detektorem. Rozdílem bylo použití gradientového typu eluce. Mobilní fáze se v obou studiích skládala z části A (ACN) a B (10 mmol/l mravenčan amonný s pH 3). Použitým systémem pro analýzu dle Marclay a spol. [43] byl Rheos 2000 CPS-LC od Flux Instrument s LTQ-MS spektrometrem od ThermoFinnigan. Kolona Phenomenex Luna HILIC (3 mm x 150 mm; 5 μm) byla chráněna další předkolonkou SecurityGuard™ HILIC (4 mm, 2 mm) s nastaveným průtokem mobilní fáze na 0,3 ml/min. Trojitý kvadrupólový spektrometr vybavený ionizačním rozhraním s atmosférickým tlakem (API) pracoval v režimu pozitivního ESI. Zvoleným přístrojem pro analýzu ve studii Pérez-Ortuño a spol. [44] byl 1200 Series HPLC systém od Agilent Technologies propojený s 6410 trojitým kvadrupólovým MS opět od Agilent Technologies. Režim práce spočíval v pozitivním ESI módu s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Při gradientové eluci nastavili Marclay a spol. [43] v první 1,5 minutě z 5 % na 40 % mobilní fázi B, za další půl minutu snížili mobilní fázi B zpět na 5 %. Pérez-Ortuño a spol. [44] nastavili mobilní fázi A na 98 % po 3 minuty, kterou následně snížili na 35 %. Od 10 do 13 minuty byla mobilní fáze A na 35 %. Následně došlo opět k zvýšení na 98 % až do konce analýzy.

Li a spol. [49] zvolili hodnoty m/z pro nikotin 163,1 na 130,2 pro kvalitu a na 117,2 pro kvantitu. Hodnoty m/z pro deuterovaný nikotin byly 167,1 na 134,2 pro kvalitu a pro kvantitu na 134,2. Pro kotinin byly zvoleny hodnoty m/z 177,1 na 98,3 pro kvalitu, pro kvantitu na 80,2. Deuterovaný kotinin měl hodnoty m/z 180,1 na 80,2 pro kvalitu a na 73,2 pro kvantitu. Marclay a spol. [43] hodnoty MRM přechodů zvolili stejně. Jen pro kvantitu kotininu byl zvolen přechod 177,1 na 146 a pro kvantitu deuterovaného kotininu 180 na 146.

Ve studii od Pérez-Ortuño [44] provedli interpretaci hmotnostních spekter pro nikotin a kotinin společně s jejich deuterovanými standardy pro určení prekurzorových iontů, jak je znázorněno na obrázku 7 a 8. Přechody MRM pro kvantifikaci byly s m/z 163 na 130 a pro identifikaci 163 na 117 pro nikotin, pro kvantifikaci m/z 167 na 134 a identifikaci m/z 167 na 121 pro nikotin d4. Pro kotinin byly nastaveny MRM přechody na kvantifikaci s m/z 177 na 80 a identifikaci 177 na 98 a pro kvantifikaci m/z 180 na 80 a identifikaci 180 na 101 pro kotinin d3.



Obrázek 7: Hmotnostní spektra molekulových iontů nikotinu a jeho IS [45]



Obrázek 8: Hmotnostní spektra molekulových iontů kotininu a jeho IS [45]

Provedená analýza HILIC-MS/MS ve studii od Li a spol. [49] vykázala vysokou výtěžnost a nízkou relativní odchylku navzdory úpravě vzorku pouhým naředěním a filtrací. Dle hodnot LOD a LOQ se jedná i o velmi citlivou techniku. Analýza podle Marclay a spol. [43] provedla úpravu vzorku LLE, která je náročnější na čas a spotřebu rozpouštědel. Hodnoty LOD a LOQ naznačují poměrně nízkou citlivost analýzy. Výtěžnost byla ale stále přijatelná s dobrou přesností. Pérez-Ortuño a spol. [44] upravili vzorek taktéž pomocí LLE. Tato analýza poskytla nejvyšší citlivost, ale zároveň i velmi nízkou výtěžnost. Pro rutinní analýzy s jednoduchou filtrací, vysokou výtěžností a přesností je nejvhodnější postup dle Li a spol. [49]. Analýza ve studii Marclay a spol. [43] lze zařadit mezi univerzální postupy s tradiční LLE úpravou vzorku a střední citlivostí. Nejlepší pro rutinní screening i přes nízkou výtěžnost, ale stále dobrou reprodukovatelnost, je postup analýzy od Pérez-Ortuño a spol. [44]. Shrnutí porovnávaných parametrů je na tabulce 5.

Tabulka 5: Souhrn stanovovaných analytů, hodnoty LOD a LOQ, výtěžnost, RSD a způsob úpravy vzorku u analýzy HILIC-MS/MS [43; 44; 49]

Studie	**LOD (ng/ml)**	**LOQ (ng/ml)**	**Výtěžnost (%)**	**RSD (%)**	**Úprava vzorku**
Marclay a spol. [43]	0,5	10	89,9-99,8	1,8-4,1	LLE
Pérez-Ortuño a spol. [44]	nikotin: 0,05 kotinin: 0,0086	nikotin: 0,3 kotinin: 0,052	58,4-68,2	0,9-3,7	LLE
Li a spol. [49]	nikotin: 0,082 kotinin: 0,077	nikotin: 0,27 kotinin: 0,26	90,4-104,6	4,2-7,1	filtrace

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na rešerši stanovení nikotinu a jeho hlavního metabolitu kotininu v moči. První část se zabývá obecnými vlastnostmi nikotinu, jeho absorpcí, distribucí, metabolismem a exkrecí. Pojednává i o chemických a fyzikálních vlastnostech kotininu a vysvětluje proč je kotinin nejdůležitějším metabolitem nikotinu. Druhá část se zabývá stanovením nikotinu a kotininu v moči. Popisuje především chromatografické metody a jejich srovnání na základě rozdílné úpravy vzorku, hodnot LOD, LOQ, výtěžnosti a RSD.

Nikotin je látkou, která působí na centrální nervovou soustavu, jak už negativně, tak v určité míře i pozitivně. V lidském těle je metabolizován z největší části na kotinin. Pro následné stanovování je kvůli delšímu biologickému poločasu rozpadu upřednostňován kotinin. Moč, jako biologický materiál, je ideální pro svoji jednoduchost při odběru.

Chromatografické techniky jsou široce používané při stanovování nikotinu a kotininu v moči. Jedná se zejména o plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Ještě před samotnou analýzou je potřeba upravit vzorek. Pro úpravu se velmi často využívají extrakční techniky. U plynové chromatografie se jedná o SPE, LLE, DLLME a MEPS. Dle zkoumaných studií a stanovených parametrů se jako nejcitlivější technikou ukázala SPE úprava vzorku. Při vysokoúčinné kapalinové chromatografii lze vzorek upravovat pomocí SPE, LLE, proteinovou precipitací, enzymatickou hydrolýzou, centrifugací, filtrací a on-line SPE. Na základě porovnání zpracovaných studií se jako nejcitlivější a nejpřesnější technikou úpravy vzorku ukazuje on-line SPE. Pro stanovení nikotinu a kotininu v moči lze použít i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s UV/VIS detektorem nebo hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] POHANISH, Richard P. Volume 2: E-O; Nabam to Norflurazon: Nicotine. In: *Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens, 3 Volume Set*. 7. vydání. Elsevier, 2017, s. 52-55. ISBN 978-0-323-38968-6.

[2] Nicotine. *Encyclopaedia Britannica* [online]. 1998, 2024-2-26 [cit. 2024-11-18]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/nicotine.

[3] Nicotine. *National Center for Biotechnology Information* [online]. 2004, 16. 11. 2024 [cit. 2024-11-24]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotine.

[4] CLAYTON, Peter M., Carl A. VAS, Tam T. T. BUI, Alex F. DRAKE a Kevin MCADAM. Spectroscopic Studies on Nicotine and Nornicotine in the UV Region. *Chirality* [online]. 2013, **25**(5), 288-293 [cit. 2024-11-24]. ISSN 0899-0042. Dostupné z: doi:10.1002/chir.22141.

[5] CAMEO chemicals. Online. 1999 [cit. 2024-11-24]. Dostupné z: https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4032.

[6] CHRISTEN, Samuel E., Laura HERMANN, Elias BEKKA, et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled Nicotine Salt and Free-Base Using an E-cigarette: A Randomized Crossover Study. *Nicotine & Tobacco Research*. 2024, **26**(10), 1313–1321.

[7] YILDIZ, Deniz. Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicon*. 2004, **43**(6), 619-632.

[8] TIWARI, Raj Kumar, Vikas SHARMA, Ravindra Kumar PANDEY a Shiv Shankar SHUKLA. Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism. *Journal of Pharmacopuncture*. 2020, **23**(1), 1-7.

[9] YUAN, Menglu, Sarah J. CROSS, Sandra E. LOUGHLIN a Frances M. LESLIE. Nicotine and the adolescent brain. *The Journal of Physiology*. 2015, **593**(16), 3395-3755.

[10] LUTTRELL, William E., Kenneth R. STILL, Jeffrey A. CHURCH a Leslie A. BEYER. Sites of Action of Chemicals Found in the Workplace: Neurotoxicology. In: *Toxicology Principles for the Industrial Hygienist*. 2. vydání. American Industrial Hygiene Association (AIHA), 2019, s. 1-14. ISBN 978-1-950286-00-3.

[11] DELIJEWSKI, Marcin, Aleksandra BARTOŃ, Paulina DELIJEWSKA, Radosław BALWIERZ, Grzegorz JAKUBIAK, Leon KOŚMIDER a Natalia PAWLAS. Genetically determined metabolism of nicotine and its clinical significance. *ACTA BIOCHIMICA POLONICA*. 2019, **66**(4), 375-381.

[12] MURPHY, Sharon E. Biochemistry of nicotine metabolism and its relevance to lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2021, **296**(100722), 1-16.

[13] LIU, Yi, Guang CHENG, JiXue CAO, Jing ZHANG, ChengHao LUO a Long HUANG. The "double-edged sword effect" of nicotine. *Fitoterapia*. 2024, **177**(106102), 1-8.

[14] MALIŃSKA, Dominika, Mariusz R. WIĘCKOWSKI, Bernadeta MICHALSKA, et al. Mitochondria as a possible target for nicotine action. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2019, **51**(3), 259–276.

[15] WANG, Hongjuan, Huan CHEN, Shulei HAN, et al. Decreased mitochondrial DNA copy number in nerve cells and the hippocampus during nicotine exposure is mediated by autophagy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021, **226**(112831), 1-10.

[16] KAMBLE, Ashwini, Praveen KHAIRKAR, Sri Prakash KALANTRI a Sneh BABHULKAR. Fatal Suicidal Attempt by Deliberate Ingestion of Nicotinecontaining Solution in Childhood-onset Depression Mediated through Internet Suicide Guideline: A Case Report. *Indian Journal of Critical Care Medicine*. 2020, **24**(8), 719-721.

[17] PubChem Compound Summary for CID 854019, Cotinine. *National center for Biotechnology Information* [online]. 2025 [cit. 2025-02-19]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/854019.

[18] Cotinine. In: *Good Laboratory Practise Bioscience* [online]. 2025 [cit. 2025-02-20]. Dostupné z: https://www.glpbio.com/cotinine.html.

[19] (-)-COTININE. *ChemicalBook* [online]. 2023 [cit. 2025-05-12]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB6402037.htm.

[20] (−)-Cotinine. *Merck* [online]. 2025 [cit. 2025-05-12]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/CZ/cs/product/sigma/c5923.

[21] BUCCAFUSCO, Jerry J. a Alvin V. TERRY JR. The potential role of cotinine in the cognitive and neuroprotective actions of nicotine. *Life Sciences*. 2003, **72**(26), 2931–2942.

[22] YU, Hui-Jin, Sangeun LIM, Min-Kyeong KIM, Seungjun LEE, Min-Jung KWON, Hyosoon PARK a Hee-Yeon WOO. Urine Cotinine level with smoking history predicts a risk of coronary artery calcification. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018, **59**(1), 146-151.

[23] FERNANDES, Andréia G.O., Leonardo N. SANTOS, Gabriela P. PINHEIRO, Diego DA SILVA VASCONCELLOS, Sérgio TELLES DE OLIVA, Bruno J.D. FERNANDES a Ricardo D. COUTO. Urinary Cotinine as a Biomarker of Cigarette Smoke Exposure: A Method to Differentiate Among Active, Second-Hand, and Non-Smoker Circumstances. *The Open Biomarkers Journal*. 2020, **10**(1875-3183/20), 60-68.

[24] ERDOGAN-KABLAN, Sevilay, Seyda YAYLA, M. Mesud HURKUL, Ahmet CETINKAYA, Emirhan NEMUTLU a Sibel A. OZKAN. Recent advancements in the bioactive alkaloids analysis in plant and biological specimen: From the perspective of activity, sample preparation, and analytical method selection. *Journal of Chromatography B*. 2025, **1258**(124592), 1-19. [25] Chromatography. In: *Chemical Engineering Design - Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design*. 3. vydání. Elsevier, 2022, s. 34-38. ISBN 978-0-12-821179-3.

[26] SINNOTT, Ray a Gavin TOWLER. Chromatography. In: *Chemical Engineering Design*. 6. vydání. Elsevier, 2020, s. 69-73. ISBN 978-0-08-102599-4.

[27] WATERS, Tony. Part I. PGC Fundamentals. In: *Process Gas Chromatographs - Fundamentals, Design and Implementation*. John Wiley, 2020, s. 1-23. ISBN 978-1-119-63304-4.

[28] MCNAIR, Harold M., James M. MILLER a Nicholas H. SNOW. Introduction. In: *Basic Gas Chromatography*. 3. vydání. John Wiley, 2019, s. 1-14. ISBN 978-1-11945-0-757.

[29] CHIADMI, Fouad a Joël SCHLATTER. Simultaneous determination of cotinine and trans-3-hydroxycotinine in urine by automated solid-phase extraction using gas chromatography–mass spectrometry. *Biomedical chromatography*. 2014, **28**(4), 453-458.

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

[31] KIM, Dae-Hyeon, Petros KOUTRAKIS a Youn-Suk SON. Preliminary study on the effect of first- and second-hand smoke of heat-not-burn tobacco products on urinary nicotine and cotinine levels and cardiovascular system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2025, **115**(104657), 1-10.

[32] LI, Yan a Jing ZHU. Determination of Nicotine and Cotinine in Urine by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*. 2016, **42**(5), 566–570. ISSN 1001-8663.

[33] LAFAY, Florent, Emmanuelle VULLIET a Marie-Magdeleine FLAMENT-WATON. Contribution of microextraction in packed sorbent for the analysis of cotinine in human urine by GC–MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **396**(1), 937–941.

[34] IWAI, Masae, Tadashi OGAWA, Hideki HATTORI, Kei ZAITSU, Akira ISHII, Osamu SUZUKI a Hiroshi SENO. Simple and rapid assay method for simultaneous quantification of urinary nicotine and cotinine using micro-extraction by packed sorbent and gas chromatography-mass spectrometry. *Nagoya Journal of Medical Science*. 2013, **75**(3-4), 255–261.

[35] MALAFATTI, Lusiane, Patricia Penido MAIA, Matheus Coutinho GONCALVES MARTINS, Maria Elisa PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA a Isarita MARTINS. Single gas chromatography method with nitrogen phosphorus detector for urinary cotinine determination in passive and active smokers. *Brazilian Journal of Pharmaceutical sciences*. 2010, **46**(4), 769-776.

[36] DONG, Michael W. Introduction. In: *HPLC and UHPLC for Practicing Scientists*. 2. vydání. John Wiley, 2019, s. 1-13. ISBN 978-1-11931-3-762.

[37] FANALI, Salvatore, Bezhan CHANKVETADZE, Paul R. HADDAD, Colin POOLE a Marja-Liisa RIEKKOLA. Milestones in the Development of Liquid Chromatography. In: *Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation, Volume 1*. 3. vydání. Elsevier, 2023, s. 1-15. ISBN 978-0-323-99968-7.

[38] FANALI, Salvatore, Bezhan CHANKVETADZE, Paul R. HADDAD, Colin POOLE a Marja-Liisa RIEKKOLA. Sample Preparation for Liquid Chromatography. In: *Liquid Chromatography - Applications, Volume 2*. 3. vydání. Elsevier, 2023, s. 1-48. ISBN 978-0-323-99969-4.

[39] PILLER, Markus, Gerhard GILCH, Gerhard SCHERER a Max SCHERER. Simple, fast and sensitive LC–MS/MS analysis for the simultaneous quantification of nicotine and 10 of its major metabolites. *Journal of Chromatography B*. 2014, **951–952**(1), 7-15.

[40] SCHEIDWEILER, Karl B., Diaa M. SHAKLEYA a Marylin A. HUESTIS. Simultaneous quantification of nicotine, cotinine, trans-3′-hydroxycotinine, norcotinine and mecamylamine in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2012, **413**(11-12), 978-984.

[41] PACI, Enrico, Daniela PIGINI, Lisa BAULEO, Carla ANCONA, Farncesco FORASTIERE a Giovanna TRANFO. Urinary Cotinine Concentration and Self-Reported Smoking Status in 1075 Subjects Living in Central Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018, **15**(804), 1-8.

[42] MILLER, Eleanor I., Hye-Ryun K. NORRIS, Douglas E. ROLLINS, Stephen T. TIFFANY a Diana G. WILKINS. A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2010, **878**(9-10), 725-737.

[43] MARCLAY, François a Martial SAUGY. Determination of nicotine and nicotine metabolites in urine by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry: Potential use of smokeless tobacco products by ice hockey players. *Journal of Chromatography A*. 2010, **1217**(48), 7528-7538.

[44] PÉREZ-ORTUÑO, Raúl, Jose M. MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, Esteve FERNÁNDEZ a José A. PASCUAL. High-throughput wide dynamic range procedure for the simultaneous quantification of nicotine and cotinine in multiple biological matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, **407**(1), 8463–8473.

[45] PETERSEN, Guilherme Oliveira, Carlos Eduardo LEITE, José Miguel CHATKIN a Flavia Valladão THIESEN. Cotinine as a biomarker of tobacco exposure: Development of a HPLC method and comparison of matrices. *Journal of Separation Science*. 2010, **33**(4-5), 516-521.

[46] OH, Jongwon, Min-Seung PARK, Mi-Ryung CHUN, Jung Hye HWANG, Jin-Young LEE, Jae Hwan JEE a Soo-Youn LEE. A Simple and High-Throughput LC–MS-MS Method for Simultaneous Measurement of Nicotine, Cotinine, 3-OH Cotinine, Nornicotine and Anabasine in Urine and Its Application in the General Korean Population. *Journal of Analytical Toxicology*. 2022, **46**(1), 25-36.

[47] SHARMA, Priyamvada, Niharika SANE, Shravanthi D. ANAND, P. MARIMUTTHU a Vivek BENEGAL. Assessment of cotinine in urine and saliva of smokers, passive smokers, and nonsmokers Method validation using liquid chromatography and mass spectrometry. *Indian Journal of Psychiatry*. 2019, **61**(3), 270-276.

[48] SHAIK, Fareeda Begum, G. NAGAJOTHI, K. SWARNALATHA, C. Suresh KUMAR a Narendra MADDU. Quantification of Nicotine and Cotinine in Plasma, Saliva, and Urine by HPLC Method in Chewing Tobacco Users. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2019, **20**(12), 3617-3623.

[49] LI, Mingxin, Qian WANG a Jing ZHU. Determination of nicotine and cotinine in urine by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*. 2017, **35**(8), 826-831.

[50] MEGER, Michael, Irmtrud MEGER-KOSSIEN, Annette SCHULER-METZ, Dinamis JANKET a Gerhard SCHERER. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2002, **778**(1-2), 251-261.

[51] E. MCGUFFEY, James, Binnian WEI, John T. BERNERT, John C. MORROW, Baoyun XIA, Lanqing WANG a Benjamin C. BLOUNT. Validation of a LC-MS/MS Method for Quantifying Urinary Nicotine, Six Nicotine Metabolites and the Minor Tobacco Alkaloids—Anatabine and Anabasine—in Smokers' Urine. *PLOS one*. 2014, **9**(7), 1-13.

[52] CHEN, Chao-Yu, Yu-Ting JHOU, Hui-Ling LEE a Yu-Wen LIN. Simultaneous, rapid, and sensitive quantification of 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine and cotinine in human urine by on-line solid-phase extraction LC-MS/MS: correlation with tobacco exposure biomarkers NNAL. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, **408**(1), 6295–6306.

[53] WINKLER, Robert. LC-MS and LC-MS/MS for Metabolomics. In: *Processing Metabolomics and Proteomics Data with Open Software - A Practical Guide*. Royal Society of Chemistry (RSC), 2020, s. 6-10. ISBN 978-1-78801-721-3.