

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie  
Klinická a toxikologická analýza

---

## **Verifikace kuřáctví analýzou kotininu v moči**

Diplomová práce

Praha 2006

Bc. Linda Zítková

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc.RNDr. Petra Rychlovského CSc. a konsultanta RNDr. Bohuslava Beneše CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Státní zdravotní ústav v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a Státního zdravotního ústavu..

V Praze dne 4.5.2006

*Zilkeová Zimová*

podpis

Děkuji svému konzultantovi RNDr. Bohuslavu Benešovi CSc. za pomoc při experimentální části práce.

Děkuji svému školiteli Doc.RNDr. Petru Rychlovskému CSc. za pomoc a trvalý zájem při zpracování experimentálních výsledků.

Děkuji Ing. Věře Spěváčkové CSc. za podnětné připomínky.

Děkuji rodičům za podporu, kterou mi poskytovali během studia.

# Obsah

Obsah	4
Seznam klíčových slov	6
Seznam použitých zkratk	7
1. Úvod	8
2. Teoretická část	9
2.1 Tabák	9
2.1.1 Historie tabáku	9
2.1.2 Tabák a jeho složení	9
2.1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti tabáku	10
2.1.4 Cigaretový tabák	11
2.1.5 Složení tabákového kouře	11
2.1.6 Farmakologické vlivy tabákového kouře	13
2.2 Kouření	13
2.2.1 Kouření a zdraví	13
2.2.2 Kouření v České republice	15
2.2.3 Pasivní kouření	17
2.3 Princip závislosti na tabáku	17
2.4 Nikotin	18
2.4.1 Fyzikálně- chemické vlastnosti	18
2.4.2 Alkaloidy obsažené v tabáku	19
2.4.3 Metabolismus a farmakokinetika nikotinu	20
2.5. Kotinin	20
2.5.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti	20
2.5.2 Metabolismus a farmakokinetika kotininu	21
2.5.3 Metody stanovení nikotinu a metabolitů v biologickém materiálu	22
2.5.3.1 Kolorimetrické stanovení kotininu	23
2.5.3.2. Standardizace výsledků	23
2.5.4. Kolorimetrické stanovení kreatininu	23
2.6 Stopové prvky v moči	24
2.6.1 Kadmium	24
2.6.2 Rtuť	24
2.6.3 Olovo	25
2.6.4 Měď	25
2.6.5 Selen	25
2.6.6 Zinek	25
2.7 Molekulová absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti	26
2.7.1 Teoretický základ	26
2.7.2 Experimentální uspořádání	27
2.7.3 Kvantitativní analýza	28
2.7.4 Kvalitativní analýza	29
3. Experimentální část	30
3.1 Chemikálie a materiál	32
3.2 Pomůcky a přístroje	32
3.3 Stanovení kreatininu	33
3.3.1 Příprava základních roztok	33
3.3.2 Měření vzorků	34

3.4	Stanovení kotininu	34
3.4.1	Příprava základních roztoků	34
3.4.2	Měření vzorků	35
3.5	Stanovení stopových prvků	35
4.	Výsledky a diskuze	36
4.1	Kalibrační závislosti	36
4.1.1	Kreatinin	36
4.1.1.1	Charakteristiky stanovení kreatininu	36
4.1.2	Kotinin	37
4.1.2.1	Charakteristiky stanovení kotininu	38
4.1.3	Stopové prvky	39
4.2	Obsah kotininu	40
4.2.1	Vliv délky kouření a počtu vykouřených cigaret denně na množství kotininu v moči	42
4.3	Obsah stopových prvků	44
4.3.1	Zpracování získaných obsahů jednotlivých stanovovaných stopových prvků v moči dárců	50
4.3.2	Kadmium	52
4.3.3	Zinek	55
5.	Závěr	58
6.	Seznam použité literatury	59

## Seznam klíčových slov

spektrofotometrie, atomová absorpční spektroskopie, moč, kouření, kuřák, nekuřák, pasivní kuřák, nikotin, kotinin, kreatinin, stopové prvky

## Seznam použitých zkratek

$t_{1/2}$	poločas rozpadu
RIA	radioimunoassay
$E_0$	základní elektronový stav
$E_e$	elektronová energie
$E_v$	vibrační energie
$E_r$	rotační energie
$E_l$	energie excitovaného stavu
$\nu$	frekvence záření
$\lambda$	vlnová délka záření
$E_0$	energie základního stavu
$\Delta E$	absorbovaná energie
T	transmitance
$\Phi$	záření propuštěné látkou
$\Phi_0$	vstupující záření
A	absorbance
$\epsilon$	molární extinkční koeficient
PVC	polyvinylchlorid
SZÚ	Státní zdravotní ústav
UV/VIS	ultrafialová a viditelná oblast
AAS	atomová absorpční spektroskopie
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
SD	směrodatná odchylka
RSD	relativní směrodatná odchylka
MD	mez detekce

# 1. Úvod

Ve Státním zdravotním ústavu se od roku 1994 do současnosti provádí preventivní program s názvem „Systém monitorování zdravotního stavu obyvatelstva ve vztahu k životnímu prostředí“. Úkolem tohoto programu je zjistit, do jaké míry je naše populace zatížena chemickými látkami z prostředí včetně potravy a na druhé straně, zda má naše populace dostatek stopových prvků s ochranným účinkem. K tomuto účelu se používají vhodné biomarkery signalizující úroveň expozice chemickým kontaminantem z prostředí.

Hladina některých biomarkerů (např. Cd, Se apod.) v tělních tekutinách a tkáních je však významně ovlivněna kouřením či expozicí tabákovým kouřem. Proto je u sledovaných osob důležité znát jejich životní zvyklosti. Dotazníkové odpovědi jsou pouze subjektivní a kuřáctví je nutno objektivizovat. Nejjednodušším způsobem, jak ověřit správnost odpovědí, je analyzovat metabolit nikotinu, kotinin, v moči. Kotinin je považován za relevantní biomarker aktivního i pasivního kuřáctví a je proto nedílnou součástí řady epidemiologických studií i monitorovacích aktivit. A právě tato ověření se stalo náplní této diplomové práce spolu s vyhodnocením jak kouření (pasivní i aktivní) ovlivňuje množství stopových prvků v těle.



## 2. Teoretická část

### 2.1 Tabák

#### 2.1.1 Historie tabáku

Počátek kouření tabáku můžeme vysledovat k civilizaci Mayů v Mexiku okolo roku 500 před n.l. Roku 1492 objevil Kryštof Kolumbus pro Evropu nejen Nový svět – Ameriku, ale i vysoce návykovou, psychotropní látku – tabák.

Původní obyvatelé Ameriky od jihu až na sever tabák kouřili, šňupali, žvýkali a pojídali tabákové listy. Kouření tabáku však mělo povětšinou kultovní charakter a bylo vyhrazeno dospělým mužům.

První tabákové semena přivezl do Evropy účastník druhé Kolumbovy výpravy – Roman Pene roku 1518 a to z provincie Tabacco na ostrově San Domingo. Odtud tedy pochází název tabák. Tabák se brzy začal pěstovat po celém světě. Z počátku bylo kouření výsadou bohatých, protože k jeho používání bylo potřeba drahých dýmek a dalšího náčiní. S výrobou dýmek hliněných a dřevěných se tato kratochvíle stala dostupná i pro lid.

V Čechách je tabák znám od konce 16. stol. díky podpoře Rudolfa II., známého ctitele alchymie. Od 17. stol. se začal rychle rozmáhat tabákový průmysl (byly např. založeny známé viržinské tabákové plantáže). Největšího rozmachu dosáhl tabák u nás v době třicetileté války. Roku 1783 zavedl Josef II. tabákový monopol. Koncem 19. stol. vznikly u nás první manufaktury na stáčení cigaret, které rychle vytlačily dýmky a doutníky. Na škodlivé účinky kouření se přišlo až v roce 1950. Do této doby byl již umožněn široký rozmach tabákového průmyslu po celém světě. [1]

#### 2.1.2 Tabák a jeho složení

Tabák, *Nicotiana tabacum*, je rostlina z rodu lilkovitých (Solanaceae). Má vejčité listy, celokrajné, pětičetné květy složené z vijanů. Plody jsou dvoupouzdrové tobolky, které se otevírají na vrcholu čtyřmi chloupěmi. Je to jednoletá, asi 1,5m vysoká

rostlina s přisedlými listy, naspodu zúženými a sbíhavými. Z různých druhů, kterých je v současné době asi 50, jsou důležité: varietas havanensis Comes, která poskytuje tzv. manilský či havanský tabák, varietas brasiliensis Comes, která se pěstuje i v Evropě, a hlavně pak varietas virginiae Comes, jejímž původním místem je povodí Orinoka a pěstuje se hlavně ve Spojených státech. Dalším nejrozšířenějším druhem je varietas macrophylla, pocházející z Mexika. Pěstuje se na celém světě a dává tzv. marylandský tabák. [2]



Obr.2.1 *Nicotiana tabacum* [3]

### 2.1.3 Fyzikální a chemické vlastnosti tabáku

Chemickou skladbu a fyzikální vlastnosti tabáku ovlivňují nejen genetické základy, ale i faktory prostředí včetně poměru minerálů v půdě, vlastností půdy, vlhkosti prostředí, teploty a intenzity slunečního záření. Vzájemný poměr těchto vlivů a cyklus trikarboxylové kyseliny pak definují konečnou kvalitu tabákových listů a kouře. Výslednou charakteristikou tabákového kouře významně ovlivňuje poloha, umístění listu na lodyze. Čím výše je list na lodyze uložen, tím je jeho zápalnost horší a objemová hodnota tabáku nižší. Množství nikotinu, prchavých fenolů, polycyklických

aromatických sacharidů je pak v hlavním proudu kouře vyšší. Umístění listu na lodyze je tedy důležitým ukazatelem fyzikálních a chemických vlastností tabáku a tedy i dobrým ukazatelem vlastností kouře. [2]

#### 2.1.4 Cigaretový tabák

Cigaretový tabák je směsí několika druhů. Jsou k němu přidávány zvlhčovací prostředky, aby byla udržena přiměřená a vhodná vlhkost, jsou přidávány přípravky, které udržují směs tabákových jemných řízků při sobě. Zvlhčovačla navíc přispívají k udržení vůně, vyvolávají pro kuřáka příjemnou chuť a přijatelnost tabáku. K zachování fyzikální integrity tabáku je používáno vhodného papíru. Všechny tyto složky ovlivňují hořlavost cigarety, počet možných inhalací, konečný výsledek hoření a chemické vlastnosti hlavního a vedlejšího proudu kouře a jeho kondenzátu. Vhodným materiálem pro soudržnost tabákových řízků jsou cukry, sirupy, lékořice a balzámy. Zlepšují nebo mění chuťové charakteristiky tabáku a jeho kouře i kvalitu hoření. Ovšem tyto látky, jakmile shoří, jsou, nebo mohou být, zdrojem nevhodných a nežádoucích, zdravotně závadných produktů. Např. lékořice může být prekurzorem polyaromatických uhlovodíků, cukry zvyšují šupinatění popela, množství nikotinu a dehtu v kouři a pokles prchavých kyselin. Přípravky ovlivňující chuť jsou do tabáku přidávány v různých fázích výroby, což je závislé na jejich prchavosti. V pozdních fázích procesu ošetřování jsou přidávány alkoholové ovocné extrakty, mentolový olej a jiné aromatické látky. Ochucující látky jsou připravovány z člověku neškodných látek. Nelze ovšem zaručit, že se pyrolýzou nezmění natolik, že se stanou škodlivými. Cigaretový papír je vyráběn s řadou dalších aditivních látek. Jeho porozita ovlivňuje hořlavost cigarety. Papír s vysokou porozitou se používá u standardních tabáků, aby snížil uvolňování dehtů, ale ne nikotinu. Obsah acetaldehydu, akroleinu, formaldehydu, oxidu uhelnatého a kyanovodíku jsou rovněž sníženy. Zároveň však stoupá pH.

#### 2.1.5 Složení tabákového kouře

Kouř aktivně vdechovaný kuřákem nazýváme hlavním proudem kouře. Aerosol, který vychází z hořícího konce cigarety mezi jednotlivými tahy, je vedlejším proudem a

je chemicky rozdílný od proudu hlavního. Kouř z cigarety je vysoce koncentrovaným aerosolem tekutých částic, které tvoří „dehet“ cigaretového kouře. Každá částice je složena ze značně rozdílných organických a anorganických látek, které jsou disperzně rozloženy v plynném prostředí, skládajícím se především z dusíku, kyslíku, vodíku, oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a velkého množství těkavých a polotěkavých organických látek. Tabákový kouř je stále se měnící směsí látek, jejichž stárnutí je další příčinou změn ve fyzikálních a chemických vlastnostech kouře. Hlavním faktorem ovlivňujícím kvalitativní i kvantitativní složení kouře je teplota. Ta je ovlivňována délkou a tloušťkou cigarety, složením a hutností tabáku, druhem tabáku či jeho směsí, hrubostí či jemností tabákových řízků, příměsí, vlhkostí, kvalitou cigaretového papíru a filtru. Během šlukování dosahuje teplota v oharku cigarety 900 °C s místy na periférii, kde je dosahováno teplot až 1050 °C. Ke tvorbě hlavního proudu kouře dochází hydrogenací, pyrolýzou, oxidací, dekarboxylací, dehydratací, chemickou kondenzací, destilací a sublimací. Vedlejší proud kouře je tvořen během doutnání oharku cigarety.

[2]

Tabákový kouř je složen z 90% z plynné fáze a zbývajících 10% jsou částičky tak malé, že je bez potíží vdechneme do plicních sklípků. Zapálená cigareta obsahuje kolem 4-5 tis. chemikálií, z tohoto nejškodlivější pro organismus jsou oxid uhelnatý, dehet a nikotin.

**Dehet** je složka kouře, je to tmavá melasovitá hmota, která se tvoří při chladnutí a kondenzaci kouře. Tato rakovinotvorná látka je nositelkou chuti a vůně, a i když by mohla být eliminována pěstováním speciálních odrůd tabáku a důslednou filtrací, výsledkem pro kuřáka by bylo vdechnutí horkého vzduchu bez chuti a vůně. Dehty se ukládají v dolních cestách dýchacích a poškozují jejich schopnost odstraňovat nečistoty vdechnuté do plic. Následkem je ranní kuřácký kašel, později se může rozvinout chronický zánět průdušek, rozedma plic a rakovina.

**Nikotin** je jeden z nejtoxičtějších jedů. Ovlivňuje především mozek a srdce a vyvolává velmi rychle závislost. Jeho vlivem se stahují cévy, tkáně a svaly nedostávají potřebné živiny a kyslík. Smrtelná dávka čistého nikotinu je 60 mg. V menších koncentracích působí jako stimulant, zvyšuje krevní tlak a srdeční tep.

**Oxid uhelnatý** vzniká jako důsledek spalování při kouření. Při vdechnutí do plic se CO velmi ochotně naváže na červené krvinky, vzniká tak škodlivý

karboxyhemoglobin, který zabrání přenosu kyslíku do buněk a tkání v těle. Nedostatek kyslíku vede k trvalému přidušování a nedostatku  $O_2$  v těle (až 15%). Tělo se snaží tento deficit vyrovnat zrychleným dýcháním a srdeční činností.

V cigaretě je dále obsaženo asi 700 aditiv, které slouží např. k lepšímu vstřebávání nikotinu, ladnému vinutí kouře nebo udržení popela na oharku atd. Tabákový kouř obsahuje kolem 100 prokázaných či potenciálních lidských kancerogenů např. kadmium, hliník, olovo, DDT, nikl, radioaktivní polonium 210, benz-a-pyren, benzen, čpavek, dibenzantracen, dále močovinu, arzén, dioxiny, formaldehyd, naftalen, kyanid, oxid uhelnatý atd. [1]

### *2.1.6 Farmakologické vlivy tabákového kouře*

Cigaretový kouř obsahuje velké množství látek, takže jeho farmakologický vliv není pouze výsledkem působení nikotinu. Je to kombinovaný efekt celého kouře, i když nikotin je jeho hlavní složkou, zodpovědnou za kuřákovu farmakologickou odpověď. Nikotin je účinné, rychle účinkující gangliostimulans, zpočátku depolarizující ganglionické buňky a stimulující jak sympatická, tak parasympatická ganglia. Absorpce nikotinu začíná v ústní dutině v závislosti na pH kouře. Zásaditý kouř doutníků a dýmek je vstřebáván převážně sliznicí ústní dutiny, kyselý kouř cigaret je absorbován převážně plicemi. Jeho pH se pohybuje mezi 5-7. Z celkového množství inhalovaného nikotinu je absorbováno asi 30 %, z toho 90 % v plicích. Retence dalších komponent kouře je velmi vysoká a pohybuje se mezi 82 a 99 %. Přesto, že pro absorpci je důležité pH kouře, hraje úlohu i jiné okolnosti a to především doba kontaktu se sliznicí, její pH, pH tělesné tekutiny, hloubka a stupeň inhalace, stupeň závislosti kuřáka, obsah nikotinu v tabáku, frekvence jednotlivých tahů. [2]

## **2.2 Kouření**

### *2.2.1 Kouření a zdraví*

Světová zdravotnická organizace pokládá v současné době kouření za nejvýznamnější jednotlivý preventabilní faktor závažné chronické nemocnosti a předčasné úmrtnosti. Kouření usmrcuje každého druhého kuřáka, ročně zemře na následky kouření téměř 5

milionů lidí, z toho v České republice 23 tisíc (16 tisíc ve věku do 69 let). Bude-li trend epidemického šíření kuřáctví i nadále pokračovat, bude kolem roku 2025 – 2030 umírat ročně 10 milionů obyvatel Země (každé 3 sekundy jeden) na nemoci související s kouřením.

Kouření přispívá k mnoha nemocem, z nichž některé jsou častými příčinami smrti :

NEMOC	PŘÍSPĚVEK KOUŘENÍ
rakovina plic a průdušek	85 – 95%
rakovina v dutině ústní, jícnu	50 – 70%
rakovina močového měchýře, ledvin	30 – 40%
rakovina slinivky břišní	30%
rakovina děložního čípku	30%
rakovina střev a konečníku	16%
chronický zánět průdušek	70%
plicní rozedma	70%
srdeční infarkt, mozková mrtvice	25%

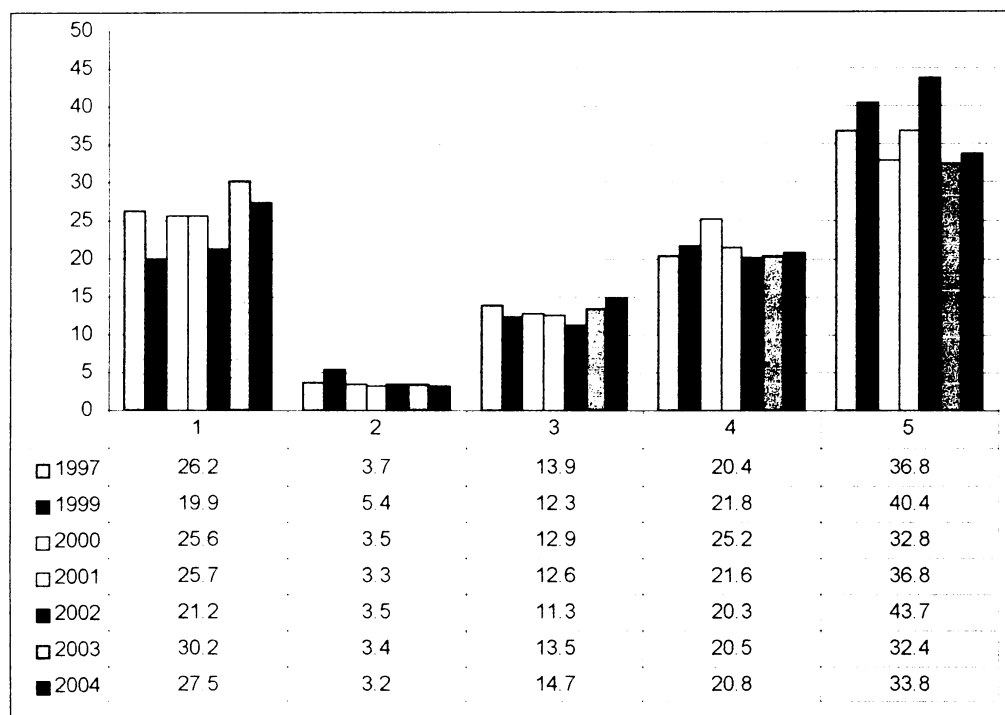
Kouření také nepříznivě ovlivňuje hojení ran, různá kožní onemocnění, urychluje tvorbu vrásek. Je rizikovým faktorem vředové choroby žaludku a dvanácterníku. Urychluje proces aterosklerosy, zejména v tepnách končetin, v aortě, ve věnčitých tepnách, v mozkových tepnách, také v cévách pánevních. V dutině ústní je u kuřáků častější parodontóza.

Kouření významně narušuje reprodukční schopnosti člověka: u kouřících mužů jsou častější poruchy erekce (spojené s impotencí), poruchy tvorby a zrání spermií (spojené s neplodností); genetické změny ve spermiích vyvolané chemickými škodlivinami v cigaretovém kouři mohou vést k vrozeným vývojovým vadám, které u dětí kuřáků pozorujeme častěji.

U kouřících žen je rovněž častější neplodnost, vznik mimoděložních těhotenství, různé poruchy průběhu těhotenství (krvácení, potraty, předčasné porody). Kouření negativně ovlivňuje délku doby kojení. Následky kouření se klinicky manifestují čím dříve, čím mladší člověk začíná pravidelně kouřit: zhoubné nádory a nemoci srdce a cév se začínají projevovat už po cca 20 letech kouření. [4]

### *2.2.2 Kouření v České republice*

Podle výzkumu z roku 2004 lze v České republice 27,5% občanů označit za pravidelné kuřáky, kouřící v současné době více jak 1 cigaretu denně. Dalších 3,2% tvoří nepravidelní (příležitostní) kuřáci, kteří kouří méně než 1 cigaretu denně. Znamená to, že dle vlastní výpovědi 30,7% občanů České republiky ve věku 15 – 64 let v roce 2004 kouřilo a lze je označit jako kuřáky. Mezi bývalé kuřáky, kteří v životě vykouřili více než 100 cigaret, avšak v současné době již nekouří, se zařadilo 14,7% dotázaných. U této části populace lze konstatovat, že se jí podařilo závislosti na nikotinu zbavit (alespoň ke dni výzkumu), i když není jisté, zda se ke kouření v budoucnosti opět někdy nevrátí. Za nekuřáky se označuje 54,6% dotázaných. Z nich 20,8% má s kouřením zkušenosti (i když v životě vykouřilo méně než 100 cigaret) a zbývajících 33,8% uvádí, že nikdy v životě nevykouřilo cigaretu.



*Obr. 2.2 Prevalence kouření v populaci (v %)*

N = 1346 (1997); N = 1340 (1999); N = 1419 (2000); N = 1265 (2001); N = 1315 (2002); N = 1412 (2003); N = 1356 (2004) [5]

Legenda: 1 – kuřák v současné době kouřící nejméně 1 cigaretu denně; 2 – kuřák v současné době kouřící méně než 1 cigaretu denně; 3 – bývalý kuřák, který v životě vykouřil víc než 100 cigaret, ale v současné době nekouří; 4 – nekouří, i když kdysi zkoušel kouřit; 5 – nekuřák, který nikdy nekouřil.

Analýza statisticky významných souvislostí ukázala, podobně jako v předcházejících letech, že muži významně častěji kouří více než 1 cigaretu denně a jsou rovněž častěji bývalými kuřáky. Ženy oproti tomu významně častěji uvádějí, že nikdy nekouřily. V roce 2004 kouřilo nejméně 1 cigaretu denně 32,2% mužů a 22,8% žen v populaci 15-64 let, méně než 1 cigaretu denně pak 2,9% mužů a 3,4% žen. [5]



### 2.2.3 Pasivní kouření

Způsobuje v zásadě stejná onemocnění jako kouření aktivní, ale v menší míře. Celkově na důsledky pasivního kouření umírají v ČR stovky osob ročně. [1]

Kouř vdechovaný při pasivním kouření pochází jednak z doutnajícího konce cigarety mezi dvěma potáhnutími a jednak je vydechován kuřákem. Ve vzduchu znečištěném tabákovým kouřem bylo prokázáno více než 5000 látek, které vznikají během procesu hoření. Odhady ale hovoří o tom, že skutečný počet látek obsažených v kouři může být 10-20 krát vyšší, tedy více než 100000 látek. [6]

Vliv pasivního kouření na děti v rodinách kuřáků se projevuje především výskytem akutních respiračních onemocnění (bronchitida, pneumonie, infekce horních a dolních dýchacích cest...), akutní a chronické záněty středouší, snížení plicních funkcí, snížení imunity, respirační symptomy (kašel, vykašlávání hlenu, sípavý hlas...)

Kouření gravidních žen může způsobit vážné poškození nebo úmrtí plodu, nižší porodní váhu, růstové opoždění, poruchu nervového systému a syndrom náhlého úmrtí novorozenců. [1]

## 2.3 Princip závislosti na tabáku

Kouření je naučené chování, které si kuřák pravidelně několikrát denně pěstuje po mnoho let. Začíná závislostí psychosociální, po určité době (dané geneticky) se přidává závislost fyzická.

**Psychosociální závislost na tabáku** nesouvisí s chemickým složením cigaret, je to potřeba v určité situaci nebo společnosti mít v ruce cigaretu, manipulovat s ní, pozorovat ladně vinoucí se kouř apod. Je to závislost na cigaretě jako takové.

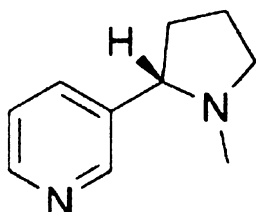
**Fyzická (drogová) závislost na nikotinu** se objeví u většiny kuřáků asi v 80% případů. Snadnost jejího vzniku je dána stavbou receptorů v mozku, je asi z 50% dědičná. Nikotin je klasická droga podobná amfetaminu, heroinu, kokainu či jiným drogám. Proto je obtížné se jí zbavit. Jako každá droga nás ale časem oklame a zradí.

**Abstinenční příznaky** z nedostatku nikotinu se objevují po hodinách a jsou to především: touha po droze, nervozita, neschopnost soustředění, podrážděnost, frustrace, zlost, špatná nálada, deprese, zvýšená chuť k jídlu, zácpa, nespavost apod. [1]

## 2.4 Nikotin

### 2.4.1 Fyzikálně- chemické vlastnosti

**Nikotin** = (S)-3-(1-methylpyrrolidin-2-yl)pyridin  
= (S)-3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl) pyridin  
= beta-pyridyl-alfa-N-methylpyrrolidin  
= 1-methyl-2-(3-pyridyl)pyrrolidin [7]



Obr.2.3 Vzorec nikotinu [8]

Tab. 2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti nikotinu

Sumární vzorec	$C_{10}H_{14}N_2$
Molekulový vzorec	$C_5H_4NC_4H_7NCH_3$
Molekulová hmotnost	162,234
Bod varu	247 °C
Bod tání	-80 °C
Bod vzplanutí	95 °C
Rozpustnost – voda	mísitelný
Rozpustnost – 95% ethanol	velmi rozpustný
Rozpustnost – Chloroform	velmi rozpustný
Rozpustnost – Éther	velmi rozpustný
Fyzikální stav, vzhled	bezbarvá až žlutá, olejová, hygroskopická kapalina s charakteristickým zápachem, po expozici ve vzduchu hnědne
Zápach	slabý rybí zápach

Pyridiniový alkaloid nikotinu je psychoaktivní látka organoleptické povahy, považovaná za hlavní příčinu závislosti na tabáku. V tabáku je doprovázen třemi minoritními alkaloidy:

nornikotinem [2-(3-pyridyl) pyrrolidin]

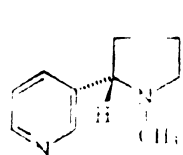
anatabinem [2-(3-pyridyl)-1,2,5,6-tetrahydropyridin]

anabasinem [2-(3-pyridyl) piperidin]

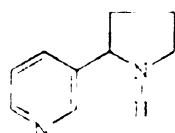
V tabáku bylo kromě těchto složek identifikováno více než 20 dalších alkaloidů.

#### 2.4.2 Alkaloidy obsažené v tabáku

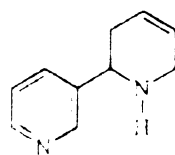
Nikotin je terciální amin skládající se z pyrrolidinového a pyridinového kruhu.



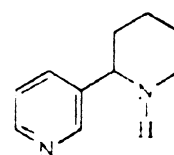
10-7. nikotin



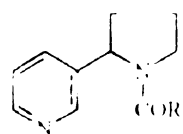
10-8. nornikotin



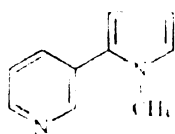
10-9. anatabin



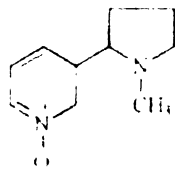
10-10. anabasin



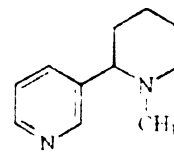
10-11. N'-acetylnikotin



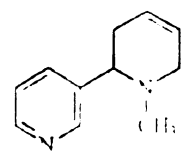
10-12. mnikotin



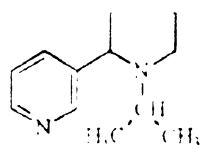
10-13. oxynikotin



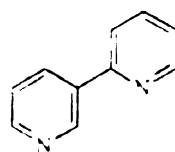
10-14. N-methylanabasin



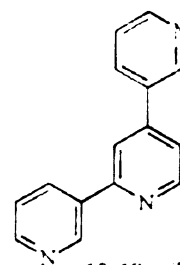
10-15. N'-methylanatabin



10-16. N-isopropynornikotin



10-17. 2,3-bipyridyl



10-18. niktellin

Obr.2.4 Alkaloidy obsažené v tabáku [9]

V cigaretách je obsaženo 6-12 mg nikotinu, kuřák zpravidla absorbuje z jedné cigarety (asi 0,8g tabáku) v průměru 1 mg nikotinu (0,37-1,56 mg).

### 2.4.3 Metabolismus a farmakokinetika nikotinu

Konečným důsledkem biotransformace může být:

*detoxikace (snížení toxicity)*

*aktivace (zvýšení toxicity)*

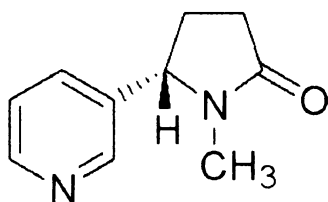
Biotransformační proces nikotinu se skládá ze dvou fází:

- I. fáze biotransformace xenobiotika (syntetická – oxidace, redukce, hydrolýza)
- II. fáze biotransformace xenobiotika (konjugační)
  - konjugace s kyselinou glukuronovou
  - konjugace acylační
  - konjugace sulfátová
  - konjugace založená na tvorbě derivátu kyseliny merkapturové
  - konjugace methylační

## 2.5 Kotinin

### 2.5.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti

**Kotinin** = S (-)-1-methyl-5-(3-pyridil)-2-pyrrolidon  
= (S)-1-methyl-5-(3-pyridyl)-2-pyrrolidinon



Obr.2.5 Vzorec kotininu [10]

Tab. 2.2 Fyzikálně chemické vlastnosti kotininu

Sumární vzorec	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Molekulová hmotnost	176,22
Bod varu	250 °C
Bod tání	40-42 °C
Bod vzplanutí	> 110 °C
Fyzikální stav, vzhled	jemně krystalická, mírně žlutá, tuhá látka

Kotinin je polárnější než nikotin díky přítomnosti karboxylové skupiny ve své struktuře.

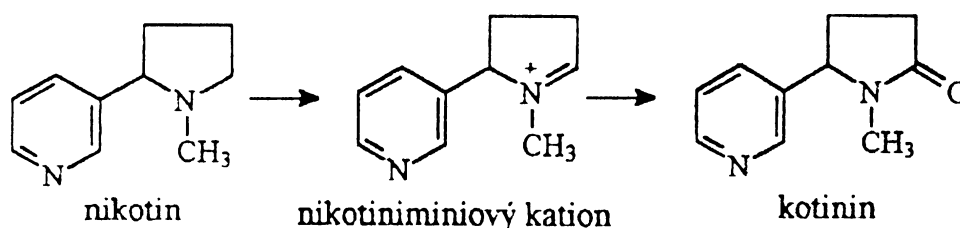
Nikotin je těkavější, lépe rozpustný v tucích ve srovnání s kotininem.

Nikotin a kotinin mají rozdílné pH. Nikotin je bazičtější než kotinin.

pH (nikotin) ~ 7,8

pH (kotinin) ~ 4,5 [7]

### 2.5.2 Metabolismus a farmakokinetika kotininu



Obr. 2.6 Metabolismus kotininu [9]

Kotinin je nejvýznamnější metabolit nikotinu, který může být užíván jako ukazatel pro aktivní kouření, ale i pro "pasivní kouření". Kotinin je obecně upřednostňován před nikotinem, kvůli jeho podstatně delšímu poločas rozpadu. Poločas rozpadu kotininu v plazmě byl odhadovaný na asi 15–20 h, poločas rozpadu nikotinu je jen 0,5–3 h. [11]

### 2.5.3 Metody stanovení nikotinu a jeho metabolitů v biologickém materiálu

Nejčastěji používaným ukazatelem pro stanovení kuřáckého návyku je stanovení kotininu v různých tělních tekutinách, sekretech a exkretech – v krvi, moči, slinách, folikulární tekutině, vlasech, semeni, mateřském mléce apod. [7] Ve vlasech je nikotin prokazatelným ukazatelem aktivního i pasivního kouření.

U kotininu je to ale jinak. Ten je ve vlasech u nekuřáků, slabých kuřáků (do 10 cigaret denně) a pasivních kuřáků téměř nestanovitelný. [12]

Kotinin bývá stanovován pro kvantifikaci výše příjmu nikotinu jak aktivním, tak i pasivním kuřákem z následujících důvodů:

- je specifický pro tabák
- je majoritní metabolitem nikotinu, odráží expozici nikotinu
- jeho exkrece je méně ovlivňována pH moči ve srovnání s nikotinem
- je snadno měřitelný v krvi, moči, slinách
- dosahuje detekovatelných koncentračních hladin v tělních tekutinách i při nízkých koncentracích
- jeho koncentrace nejsou příliš ovlivněny vedlejšími faktory (dieta, životní prostředí..)
- průměrný biologický poločas v krvi (16-20h) je v porovnání s jinými metabolity (nikotin  $t_{1/2} \sim 2-3h$ ) dostatečně dlouhý

Pro kvantifikaci obsahu nikotinu, kotininu a dalších metabolitů v různém biologickém materiálu je možné použít více instrumentálních analytických metod, které se liší ve své selektivitě, citlivosti, mezi detekce a mnoha dalších attributech.

Jedná se o následující metody:

- chromatografické metody (plynová, kapalinová)
- radioimunoassay (RIA)
- kolorimetrie (spektrofotometrie ve viditelné oblasti)

### 2.5.3.1 Kolorimetrické stanovení kotininu

Kolorimetrické metody pro objektivní testování kuřáckého návyku jsou založeny na modifikacích Koenigovy reakce [7].

Koenigova reakce je založena na tvorbě barevných produktů ze sloučenin obsahujících pyridin na základě reakce s chlorkyanem (CNCl) a primárním aminem. Při reakci dochází k otevření pyridinového kruhu kotininu reakcí s chlorkyanem za tvorby příslušného glutakonaldehydu, který reaguje s barbiturovou kyselinou za tvorby oranžově zbarveného komplexu.

### 2.5.3.2. Standardizace výsledků

Při provádění analýz odebraných vzorků se postupuje dle metod vyhlášených hlavním hygienikem ČR. Tyto metody se považují za standardní. Výsledky analýz je možné vyjádřit více způsoby:

- a) jako podíl koncentrace indikátoru v moči a koncentrace kreatininu stanoveného ve stejném vzorku moči (g/l, mmol/l)
- b) jako koncentrace indikátoru v moči korigované na standardní hustotu moči (1,024)
- c) jako množství indikátoru vyloučené za jednotku času (s) v přepočtu na 1 kg hmotnosti vyšetřované osoby
- d) jiným způsobem uvedeným v příslušném metodickém návodu [7]

V této práci byl použit přepočet na hustotu moči vyjádřenou množstvím kreatininu.

### 2.5.4. Kolorimetrické stanovení kreatininu

Kreatinin (kys.methylguanidinoctová) je anhydrid kreatinu, který se tvoří ve velkém množství ve svalech, ireversibilním a neenzymovým odstraněním vody z kreatinfosfátu. Volný kreatinin se vyskytuje jak v krvi, tak především v moči. Tvorba kreatininu je nezbytným předpokladem pro vylučování kreatinu. Množství kreatininu vylučované u jednoho a téhož jedince je každý den pozoruhodně konstantní.

Koncentrace kreatininu v moči nezávisí na potravě a je spíše obrazem katabolických dějů ve svalu a řídí se spíše velikostí masy svalovin resp. její aktivitou.

Nejvíce postupů stanovení kreatininu je založeno na Jaffého reakci [13]. Ta je založena na formování oranžově-červeného produktu reakce kreatininu a alkalického pirátu při alkalickém pH v poměru 1:1. [13] Metoda využívá reakce aromatických nitrolátek s látkami obsahujícími aktivní methylenovou (=CH) nebo methinovou (=C) skupinu. Kreatinin se v alkalickém prostředí ionizuje a skupina =CH reaguje s kyselinou pikrovou za vzniku barevného produktu. Hlavním nekreatininovým chromogenem jsou vodíkové ionty, proto musí reakce probíhat v silně alkalickém prostředí, stanovení vyžaduje deproteinaci [7].

## 2.6 Stopové prvky v moči

### 2.6.1 Kadmium

Zátěž organismu Cd lze sledovat vyšetřením jeho hladiny v krvi, moči a vlasech. Cd v moči je především indikátorem celkové tělesné zátěže a poskytuje informace o množství Cd kumulovaného v organismu. Biologický poločas se odhaduje na 15 – 30 let. Hladina Cd v moči se pohybuje obvykle v rozsahu 0,1 – 0,7  $\mu\text{g/g}$  kreatininu u nekuřáků, o něco vyšší hodnoty se obvykle vyskytují u kuřáků.

### 2.6.2 Rtuť

Rtuť se vyskytuje ve formě kovové rtuti, či jako anorganická a organická sloučenina. K expozici dochází požitím, inhalací i kožní resorpcí. Koncentrace kovové rtuti v potravě je obecně nízká a denní přívod se obecně pohybuje pod 1  $\mu\text{g}/\text{den}$ .

Koncentrace v moči se vztahuje především k expozici kovové rtuti či jejím anorganickým formám. U neprofesionální expozice jsou hodnoty obvykle pod 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Hladina Hg v moči v rozsahu 25 – 100  $\mu\text{g}/\text{l}$  signalizuje řadu nespecifických toxických symptomů [14].



### 2.6.3 Olovo

Olovo je jedním z nejsledovanějších toxických prvků vzhledem ke své toxicitě a rozšíření v životním prostředí. [15] Pro člověka je hlavním zdrojem expozice znečištěná atmosféra a kontaminovaná potrava. Koncentrace olova v moči se pohybuje kolem hodnot 3,25 µg/g kreatininu.

### 2.6.4 Měď

Měď patří mezi prvky, které jsou pro člověka na jedné straně esenciální, na druhé straně potenciálně toxické. Denní příjem mědi u dospělého člověka je 1 – 3 mg. Na měď bohaté je maso, ryby, zelenina a vnitřnosti [16].

### 2.6.5 Selen

Selen patří mezi esenciální stopové prvky. V organismu se selen vyskytuje vázaný v aminokyselinách, je také součástí některých enzymů a enzymových systémů. Zjišťování množství selenu v organismu je především využíváno pro určení deficitu tohoto prvku, který má výrazný význam v prevenci oxidačního stresu.

Vylučování moči se rychle mění v souvislosti s příjmem selenu a hodnoty se pohybují v rozsahu 10 – 600 µg/den podle charakteru přijímané stravy.

### 2.6.6 Zinek

Význam tohoto prvku je u profesionálně neexponované populace především benefiční. Zn je součástí více než 200 důležitých enzymů, podílí se na syntéze proteinů, je obsažen v insulinu [14].

Hladiny v moči, které jsou závislé na více faktorech, se používají zejména pro stanovení deficitu zinku. Hodnoty se pohybují v rozmezí 300 – 1000 µg/den [15].

## 2.7 Molekulová absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti

Tato metoda se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200 až 800 nm.

Látky, které absorbují záření s vlnovou délkou menší než 380 nm (ultrafialové záření), se jeví oku jako bezbarvé. Látky absorbující z bílého slunečního záření vlnové délky v rozsahu 380 až 770 nm se oku jeví jako barevné.

Vizuální absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti (kolorimetrie) je jednou z nejstarších fyzikálně-chemických metod. Umožňovala s použitím jednoduchých zařízení sledovat a vyhodnocovat roztoky barevných látek. Také v současné době lze absorpční spektrální analýzu pro její rychlost, experimentální nenáročnost i přesnost a citlivost považovat za jednu z nejužívanějších metod.

### 2.7.1 Teoretický základ

Předpokládejme, že za normálních podmínek se molekula látky nachází v základním elektronovém stavu  $E_0$  a její energie je rovna součtu základní elektronové  $E_e$ , vibrační  $E_v$  a rotační  $E_r$  energie (2.1):

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad (2.1)$$

Pohlcením fotonů záření z viditelné oblasti elektromagnetického spektra přechází molekula do excitovaného stavu. Její setrvání v tomto energeticky bohatším stavu je krátké (řádově  $10^{-9}$  s) a přechází různými deexcitačními přechody (zářivými i nezářivými) za předání energie zpět do základního stavu. Tím je v absorbujícím systému udržována rovnováha odpovídající přebytku molekul v základním stavu.

Absorbovaná energie, která je rovna rozdílu energie stavu excitovaného  $E_1$  a energie stavu základního  $E_0$ ,  $\Delta E$ , musí být rovna přijatému kvantu záření v soulase s rovnicí (2.2):

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \nu = h c / \lambda = \Delta E_c + \Delta E_v + \Delta E_r, h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \quad (2.2)$$

$\nu$  je frekvence záření,  $\lambda$  je vlnová délka záření a  $c = 3 \cdot 10^{10} \text{ cm s}^{-1}$ .

### 2.7.2 Experimentální uspořádání

Měření absorpce v ultrafialové a viditelné oblasti spektra se provádí pomocí různých typů přístrojů, které také z historického hlediska mohou mít různé názvy (kolorimetr, fotometr, spektrofotometr).

Látky, které absorbují záření v ultrafialové oblasti, se oku jeví jako bezbarvé. Barevnost látek je důsledkem absorpce záření ve viditelné oblasti: látka absorbuje z bílého (viditelného) světla jen záření určité vlnové délky a záření ostatních vlnových délek, které vzorkem jen procházejí, se skládá v tzv. doplňkové (komplementární) zbarvení. Na této skutečnosti je založena kolorimetrie, historicky nejstarší a nejjednodušší metodika, využívající jen viditelné oblasti spektra.

Spektrofotometrie umožňuje získat spektra ve viditelné i ultrafialové oblasti, monochromatické záření se z primárního zdroje získává pomocí monochromátorů, detekce záření je objektivní.

Jako **zdroj** pro viditelnou oblast se používá wolframové nebo halogenové žárovky, které vysílají spojité záření až do 3  $\mu\text{m}$ .

Pro získání **monochromatického záření** se používají mřížky ve spojení se vstupní a výstupní štěrbinou. Spektrální šířka štěrbinou má být aspoň pětkrát menší než je pološířka měřeného absorpčního pásu.

**Absorbující prostředí** je realizováno kyvetami. Kyvety mají konstantní známou vnitřní tloušťku absorbující vrstvy od 0,1-10 cm. Nejčastěji se používá 1 cm kyveta. Pro viditelnou oblast se používají skleněné kyvety.

Vyhodnocení velikosti absorpce ve spektrofotometrii se provádí pomocí fotoelektrických detektorů (fotočlánků) citlivých na viditelné záření.

Typy přístrojů dle uspořádání základních prvků jsou:

**a) jednopaprskový spektrofotometr** - záření prochází ze zdroje po nastavené vlnové délky v monochromátoru nejprve kyvetou obsahující srovnávací vzorek, kde je poněkud zeslabeno a dopadá na detektor. Vzniklý fotoelektrický proud je změřen a je mu přiřazena nulová hodnota absorbance. Po nahrazení kyvety se srovnávacím roztokem kyvetou se vzorkem je pak změřena jeho absorbance.

**b) dvouprskový spektrofotometr** – paprsek je po výstupu z monochromátoru rozdělen na paprsek procházející měrnou a srovnávací kyvetou.

### 2.7.3 Kvantitativní analýza

Pro hodnocení velikosti absorpce v absorpčních metodách se využívá měření propustnosti a odvozených veličin, nejčastěji absorbance. Je však nutno brát v úvahu, že záření vstupující do hmotného prostředí je tímto prostředím absorbováno, část je propuštěna, ale část může být také rozptýlena nebo odražena.

**Propustnost  $T$  (transmittance)** – poměr toku monochromatického záření propuštěného látkou po absorpci  $\Phi$  k toku vstupujícího záření  $\Phi_0$  (2.3):

$$T = \Phi / \Phi_0 \quad (2.3)$$

**Absorbance  $A$**  je definována takto (2.4):

$$A = \log \Phi_0 / \Phi = - \log T \quad (2.4)$$

Pro kvantitativní účely se používá **Lambertova – Beerova zákona**. (2.5)

$$A = c \cdot \epsilon \cdot l \quad (2.5)$$

$A$  = absorbance,  $c$  = koncentrace,  $\epsilon$  = molární extinkční koeficient,  $l$  = délka kyvety,

Základní podmínkou pro jeho platnost je, aby veškerá látkou absorbovaná energie přecházela v energii tepelnou a ta byla uvolňována jen kolozními deaktivacemi. To znamená, že nesmí docházet k fluorescenci nebo rozptylu záření např. na koloidních

částicích v roztoku index lomu měřeného roztoku ( $n$  standardů) musí být konstantní. To je splněno pro zředěné čiré roztoky absorbujících látek s koncentrací menší než  $10^{-2}$  M.

#### *2.7.4 Kvalitativní analýza*

Poloha absorpčních pásů ve viditelné spektrofotometrii je dána absorbovanou energií při elektronovém přechodu a souvisí se strukturou látky. Je charakteristická pro část molekuly (chromofor) a je ovlivněna substituenty i použitým rozpouštědlem. Identifikace látky jenom podle získaného absorpčního spektra ve viditelné oblasti však obvykle není jednoznačná. [17]

### 3. Experimentální část

Vzorky moče byli získávány od dobrovolných dárců na transfúzních stanicích. Moč byla odebrána do předem vymytých PVC nádobek. Ty byly po dobu 24 hodin namočeny v 10% HNO<sub>3</sub> a poté vypláchnuty destilovanou vodou. S dobrovolníky byl vyplněn dotazník týkající se kouření, nemocí, expozicí apod.. (Obr. 3.1) Po odebrání vzorků od dárců, byla moč zmrazena. Při transportu do SZÚ bylo dohlíženo na teplotu při přepravě, aby nedošlo k rozmrazení moče. V získaných vzorcích bylo změřeno množství kreatininu, kotininu a obsah stopových prvků (Cd, Cu, Hg, Pb, Zn, Se). Obsah stopových prvků byl analyzován ve Zdravotním ústavu se sídlem ve Žďáru nad Sázavou. V této práci byly získané výsledky vyhodnoceny z hlediska vlivu kouření na obsah stopových prvků v těle.

Pro měření kotininu v moči je popsáno několik možných metod. V této diplomové práci byla použita metoda spektrofotometrického stanovení kotininu a to z důvodů malých nákladů, větší produktivity, vysoké citlivosti a odpovídající selektivitě. Dalšími použitelnými metodami je plynová a kapalinová chromatografie a také imunologické metody (RIA).

## Dotazník pro odběr biologického materiálu – dospělí

(Zakroužkujte nebo vpište správnou odpověď)

Kód vzorku   - A / 0 5 / 0   Datum   den   měsíc  0  5

Jméno           Příjmení

Datum narození   měsíc   den   Věk

Vzdělání:  Základní škola  Střední škola  Vysoká škola

Hmotnost    kg Výška    cm

Adresa: Druh odebraného vzorku: K-krev *Ano – Ne*  
M-moč *Ano – Ne*

Délka bydliště v lokalitě v celých rocích

Pracuje jako: Pracovní expozice: (chemie, záření, infekce, jiné)

Kuřák: *Ano – Ne* Počet vykouřených cigaret denně

Délka kouření (v celých rocích)

Bývalý kuřák: *Ano – Ne* Bývalý kuřák – nekouří měsíců

Pasivní kouření (kouření v domácnosti, příp. na pracovišti): *Ano – Ne*

Pravidelné užívání léků: *Ano – Ne*  
Druh užívaných léků (např. sedativa, léky na zvýšený krevní tlak, apod.):

Užívání hormonálních přípravků (např. antikoncepce, aj.) *Ano – Ne*  
Pokud ano, doba užívání (roky):

Užívání potravních doplňků (vitaminy, minerální látky, atd.): *Ano – Ne*  
Četnost užívání (kolikrát týdně):

Virové onemocnění v posledních 3 měsících: *Ano – Ne*

Očkování v posledních 3 měsících: *Ano – Ne* Pokud ano, proti čemu:

Rtg vyšetření v posledních 3 měsících: *Ano – Ne* Pokud ano, čeho:

Jiné:

Obr. 3.1 Dotazník pro dobrovolné dárce

### 3.1 Chemikálie a materiál

kyselina dusičná ( $\text{HNO}_3$ ,  $M_r = 63,018$ ) p.a ( Merk, NSR)  
kyselina pikrová ( $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ ,  $M_r = 229,11$ ) p.a ( Merk, NSR)  
hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ ,  $M_r = 40,00$ ) p.a ( Merck, NSR)  
kreatinin ( $\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$ ,  $M_r = 113,12$ ) p.a ( Merck, NSR)  
destilovaná voda ( $< 18,2 \Omega/\text{cm}$ )  
acetátový pufr (pH 4,7) (přípraven v přípravně roztoků SZÚ)  
kyanid draselný ( $\text{KCN}$ ,  $M_r = 65,12$ ) p.a. (Merk, NSR)  
chloramin T trihydrát ( $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNaNO}_2\text{S} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ) p.a. (Merck, NSR)  
kyselina barbiturová ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $M_r = 128,09$ ) p.a. (Merck, NSR)  
aceton ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ,  $M_r = 58,08$ ) p.a. (Lach – Ner, s.r.o.)  
(-) – kotinin ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$ ,  $M_r = 176,22$ ) p.a. (Sigma-Aldrich)  
biologické vzorky moče dodané z:  
    ZÚ Liberec  
    ZÚ Praha  
    ZÚ Ostrava  
    ZÚ Zlín (Kroměříž, Uherské Hradiště)

### 3.2 Pomůcky a přístroje

předvážky Model 333 (Acculab)  
analytické váhy TE214S-OCE (Sartorius)  
skleněné kyvety S/G5 (Fisher Scientific)  
skleněné kyvety (HELLMA)  
mikropipeta FINNPIPETTE (Labsystems)  
automatické pipety FINNPIPETTE různých objemů (Labsystems)  
UV/VIS spektrofotometr Lambda 2S (Perkin Elmer) - dvoupaprskový spektrofotometr  
laboratorní sklo ( zkumavky, kádinky, pipety, lodičky)



### 3.3 Stanovení kreatininu

#### 3.3.1 Příprava základních roztoků

##### 1. *Nasyčený roztok kyseliny pikrové*

Do zvoleného objemu (500 ml) destilované vody jsem za laboratorní teploty přidávala po dobu 24 hodin kyselinu pikrovou. Nádobu s kyselinou jsem průběžně promíchávala, aby došlo k rychlejšímu rozpouštění. Připravený roztok jsem zfiltrovala.

##### 2. *10% roztok hydroxidu sodného*

Do 100 ml odměrné baňky jsem navázila 10 g NaOH a doplnila destilovanou vodou na 100 ml.

##### 3. *Kyselina chlorovodíková 0.1 mol / l*

Do 100 ml odměrné baňky jsem napipetovala 0.85 ml 37% HCl a doplnila do 100 ml destilovanou vodou.

##### 4. *Základní roztok kreatininu*

0.2262 g kreatininu přesně, jsem rozpustila v 50 ml odměrné baňce v 0.1 mol/l HCl a doplnila po rysku. Výsledná koncentrace odpovídá 40 mmol kreatininu/l.

##### 5. *Reakční činidlo*

Těsně před vlastním měřením jsem si připravovala reakční činidlo. Nasyčený roztok kyseliny pikrové jsem smíchala s 10% vodným roztokem NaOH v poměru 10:0,75 a dobře promíchala. Množství jsme volila dle celkového počtu vzorků (vlastní vzorky, kalibrace, slepý vzorek, referenční materiál). Reakční činidlo je použitelné 1h po jeho přípravě. Spotřeba činidla na 1 vzorek byla 2 ml.

##### 6. *Pracovní roztoky kreatininu*

Připravila jsem si vodné roztoky kreatininu o koncentraci 4, 12, 16, 20 mmol/l

### 3.3.2 Měření vzorků

Před samotným měřením vzorků bylo potřeba připravit kalibrační křivku.

Z připravených pracovních roztoků kreatininu o koncentraci 4 - 12 - 16 - 20 mmol/l jsem pipetovala 0,02 ml do zkumavek, kde jsem je smíchala s 2 ml reakčního činidla, vše jsem dobře promíchala a po 10 minutách jsem přidala 3 ml destilované vody, opět jsem vše dobře promíchala a po 5 minutách stání jsem změřila absorbanci při 520 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek obsahoval stejné reagenty, jen místo pracovních roztoků kreatininu jsem pipetovala 0,02 ml destilované vody.

Vzorky moče jsem nechala před měřením rozmrznout a vytemperovat na laboratorní teplotu. Postup při měření vzorků byl totožný s postupem při přípravě kalibrační křivky. Pouze místo pracovních roztoků kreatininu jsem do zkumavek pipetovala 0,02 ml moče.

## 3.4 Stanovení kreatininu

### 3.4.1 Příprava základních roztoků

#### 1. 4M acetátový pufr (pH 4,7)

Pufr byl připraven v přípravně roztoků v SZÚ

#### 2. 10% roztok kyanidu draselného

1g kyanidu draselného jsem rozpustila v 10 ml destilované vody. Roztok kyanidu draselného musí být čerstvě připravený.

#### 3. 10% roztok chloraminu T

1g chloraminu T jsem rozpustila v 10 ml destilované vody

#### 4. 1% roztok kyseliny barbiturové ve směsi aceton-voda 1-1

0,25g kyseliny barbiturové jsem rozpustila ve 25 ml roztoku připraveného z 12,5 ml destilované vody a 12,5 ml acetonu

### 5. Pracovní roztoky kotininu

Připravila jsem si vodné roztoky kotininu o koncentraci 1, 2, 4, 8, 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

#### 3.4.2 Měření vzorků

Kalibrační křivky byly při tomto měření sestrojeny 2 ( **A** ve vodě, **B** v moči nekuřáka). Do zkumavek č. 2, 3, 4, 5, 6 v obou sériích jsem pipetovala 0,05 ml z připravených vodných roztoků kotininu o koncentracích 1, 2, 4, 8 a 16  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (do zkumavek č.1 v obou řadách jsem pipetovala 0,05 ml destilované vody – slepý vzorek). Do každé zkumavky série **A** jsem přidala 0,45 ml destilované vody, do každé zkumavky série **B** jsem pipetovala 0,45 ml moče nekuřáka. Všechny zkumavky jsem důkladně promíchala. Poté jsem přidala 0,2 ml 4M acetátového pufru (pH 4,7) a poté v 15 sec. intervalech jsem přidávala postupně 0,1 ml čerstvě připraveného 10% roztoku kyanidu draselného, 0,1 ml 10 % roztoku chloraminu T a 0,5 ml 1% roztoku kyseliny barbiturové ve směsi aceton-voda 1+1. Po 20 minutách stání jsem změřila absorbanci obou sérií při 506 nm proti slepému vzorku. Barevná změna se objevila v průběhu 2 – 5 minut; 20 minut je potřeba k úplnému vybarvení. Po této době dochází k pomalému slábnutí barevné reakce až do úplné ztráty barvy (toto však tvá několik hodin).

Kalibrační křivky **A** a **B** by měly být rovnoběžné.

Vzorky moče jsem opět před měřením nechala rozmraznout a vytemperovat na laboratorní teplotu. Do zkumavek jsem pipetovala 0,5 ml moče. Přidávané reagenty i časové intervaly byly stejné jako při přípravě kalibrační křivky. Koncentraci kotininu ve vzorcích moči jsem odečítala z kalibrační křivky **B**.

#### 3.5 Stanovení stopových prvků

Prvky Cu, Cd, Pb byly stanoveny metodou AAS – elektrotermická atomizace na přístroji GBC 932AA. Prvek Se také metodou AAS – elektrotermická atomizace, ale v tomto případě byl použit přístroj Varian 280Z. Zinek byl stanoven metodou AAS – plamenová technika na přístroji GBC 932AA. Rtuť byla stanovena technikou studených par na analyzátoru AMA 254.

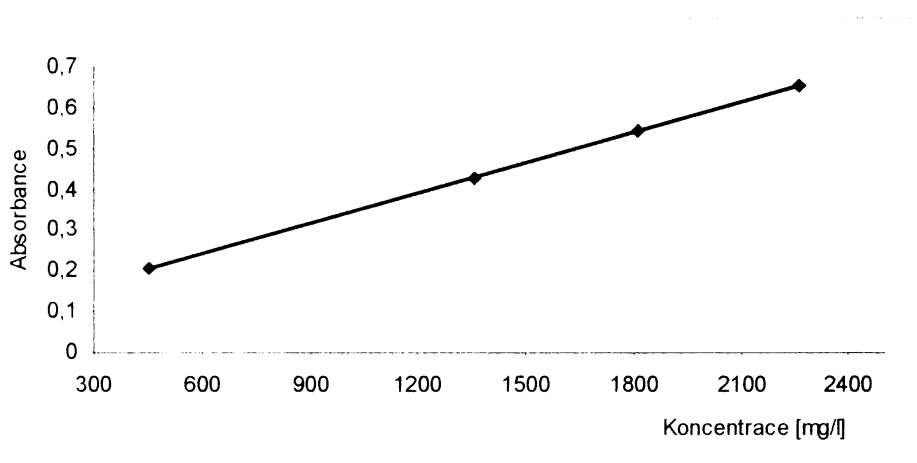
## 4. Výsledky a diskuze

Pro analýzu kreatininu a kotininu jsem využívala již vypracované standardní operační postupy. Stanovení těchto látek jsem tedy neoptimalizovala, ale proměřila jsem rovnou kalibrační závislosti.

### 4.1 Kalibrační závislosti

#### 4.1.1 Kreatinin

Před samotným stanovením množství kreatininu ve vzorcích, jsem proměřila kalibrační závislost v rozsahu koncentrací 450 – 2200 mg/l. Protože se hodnoty kreatininu pohybují v rozmezí 450 - 2200 mg/l, byla použita technika zkrácené kalibrační křivky.



Obr. 4.1 Kalibrační křivka kreatininu. Rovnice regrese  $y = 0.0002x + 0.0921$

#### 4.1.1.1 Charakteristiky stanovení kreatininu

Součástí kalibrace bylo i určení opakovatelnosti, meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Mez detekce byla zjištěna jako 3x směrodatná odchylka a mez stanovitelnosti jako 10x směrodatná odchylka stanovení slepého pokusu. Směrodatnou odchylku stanovení jsem zjistila z 10-ti měření slepého vzorku ( $SD = 7,69$ ). Hodnota LOD odpovídala 23,06 mg/l a hodnota LOQ byla 76,87 mg/l.

Opakovatelnost jsem vyjádřila pomocí RSD (relativní směrodatná odchylka) a její hodnota byla 2%. Citlivost jsem určila z rovnice regrese kalibrace jako její směrnici. Při stanovení kreatininu jsem měla k dispozici i referenční materiál, který jsem využila pro kontrolu správnosti stanovení. Přehled zjištěných hodnot uvádím v následujících tabulkách (Tab.4.1 a, b).

Tab.4.1 Charakteristiky stanovení kreatininu

a)

Měření	Referenční materiál	Kontrolní vzorek
	[mg/l]	[mg/l]
1	1427	1180
2	1480	1156
3	1426	1170
4	1399	1136
5	1443	1171
6	1409	1141
7	1415	1141
8	1441	1169
9	1447	1190
10	1433	1172
<b>Průměr [mg/l]</b>	<b>1432</b>	<b>1162</b>
<b>SD [mg/l]</b>	<b>23</b>	<b>18</b>
<b>RSD [%]</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

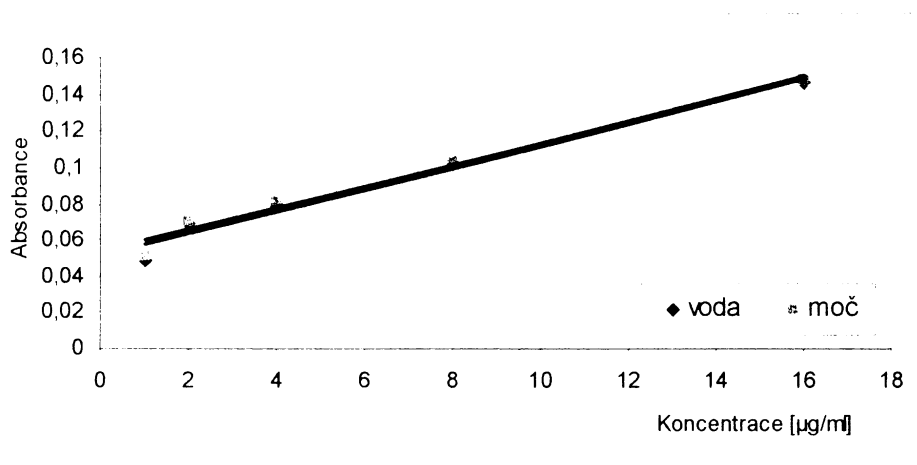
b)

Referenční materiál [mg/l]		Citlivost	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
Referenční hodnota	Naměřená hodnota			
1390±203	1432 ± 23	0.0002	23.06	76,87

#### 4. 1.2 Kotinin

V případě kotininu jsem kalibrační závislost proměřovala dvakrát v různé matrici vzorku. Jednou byla matricí voda a po druhé moči nekuřáka. Obě křivky byly rovnoběžné se stejnou směrnici; to potvrzovalo správnost vypracované metodiky a nulový vliv matrice vzorku na stanovení. Kalibrační závislost jsem proměřila v rozsahu

koncentrací 1 - 16 µg/ml. Protože se hodnoty kotininu pohybují v rozmezí 1 - 16 µg/ml, byla použita technika zkrácené kalibrační křivky.



Obr. 4.2. Kalibrační křivka kotininu. Rovnice regrese  $y = 0.0059x + 0.054$

#### 4.1.2.1 Charakteristiky stanovení kotininu

I v tomto případě jsme si určila opakovatelnost, LOD a LOQ. Mez detekce byla zjištěna jako 3x směrodatná odchylka a mez stanovitelnosti jako 10x směrodatná odchylka stanovení slepého pokusu. Směrodatnou odchylku stanovení jsem zjistila z 10-ti měření slepého vzorku ( $SD = 0,15$ ). Hodnota LOD odpovídala 0,44 µg/ml a hodnota LOQ byla 1,46 µg/ml.

Opakovatelnost jsem vyjádřila pomocí RSD a její hodnota byla 11%. Citlivost jsem určila z rovnice regrese kalibrace jako její směrnici.

Výsledky jsou v Tab.4.2 a, b.

Tab. 4.2 Charakteristiky stanovení kotininu

a)

Měření	Kontrolní měření [ $\mu\text{g/ml}$ ]
1	4.99
2	5.18
3	4.73
4	3.89
5	4.85
6	3.86
7	4.25
8	5.12
9	4.06
10	4.50
<b>Průměr [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>4.54</b>
<b>SD [<math>\mu\text{g/ml}</math>]</b>	<b>0.50</b>
<b>RSD [%]</b>	<b>11</b>

b)

Citlivost	LOD [ $\mu\text{g/ml}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
0.0059	0.44	1.46

#### 4.1.3 Stopové prvky

Obsah stopových prvků byl měřen v laboratoři Zdravotního ústavu se sídlem ve Žďáru nad Sázavou. V Tab.4.3 uvádím charakteristiky stanovení jednotlivých stopových prvků.

Tab. 4.3 Charakteristiky stanovení stopových prvků

Prvek	LOD [µg/l]	Relat.roz. nejistota[%]	Opakovatelnost [%]	Typ přístroje	Metoda
Cu	1,6	9,23	4,67	GBC 932AA	AAS - elektroterm. atomizace
Cd	0,09	8,4	7,21	GBC 932AA	AAS - elektroterm. atomizace
Pb	0,5	8,83	3,96	GBC 932AA	AAS - elektroterm. atomizace
Se	1,2	10,2	7,25	Varian 280Z	AAS - elektroterm. atomizace
Zn	3,6	3,91	1,37	GBC 932AA	AAS - plamenová technika
Hg	0,08	5,01	3,16	AMA254	CVAAS – technika studených par

LOD = mez detekce

AAS = atomová absorpční spektroskopie

## 4.2 Obsah kotininu

V rámci diplomové práce jsem analyzovala celkem 275 vzorků. Tyto vzorky byly získány od dárců rozdělených do 5 lokalit. Počet vzorků a jednotlivé oblasti jsem uvedla v Tab. 4.4 .

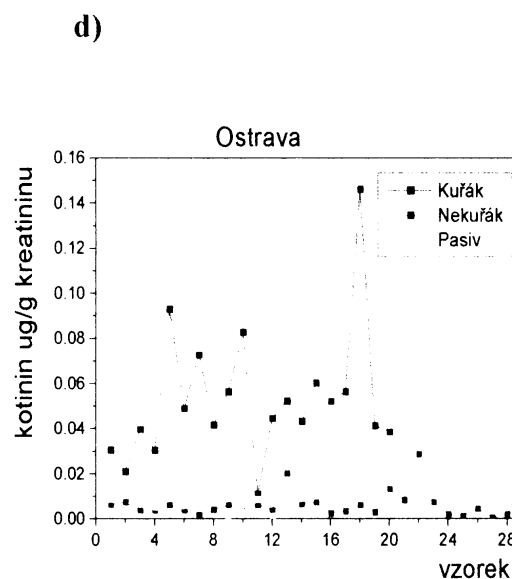
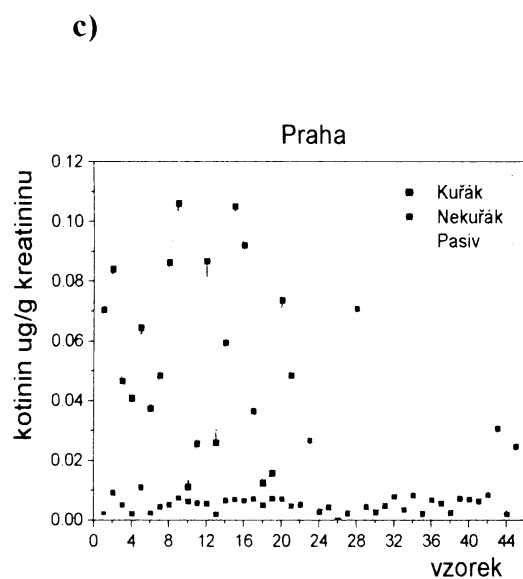
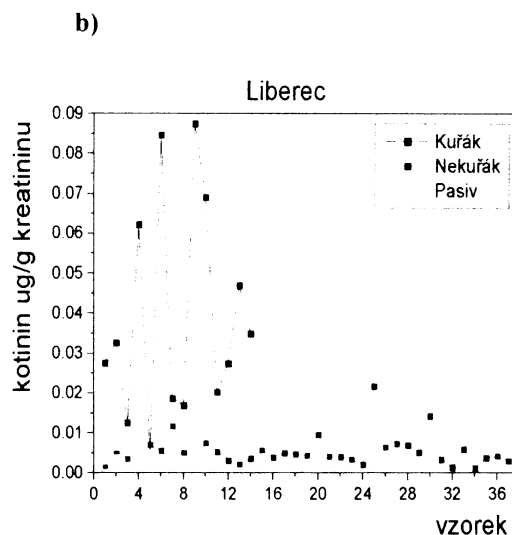
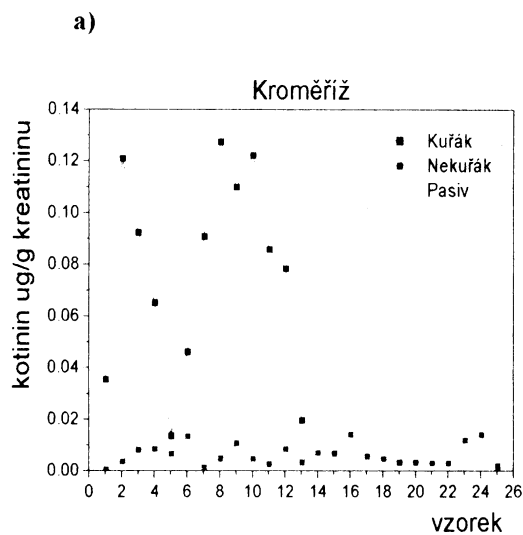
Tab.4.4 Počet dobrovolných dárců v lokalitách

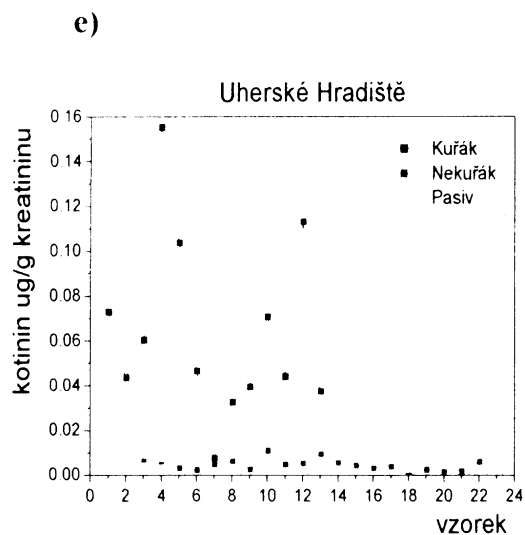
Lokalita	Počet vzorků
Uherské Hradiště	40
Liberec	61
Praha	72
Ostrava	63
Kroměříž	39
<b>Celkem</b>	<b>275</b>

Analýzou vzorků moči jednotlivých respondentů jsem zjistila, že množství stanoveného kotininu v moči koresponduje s odpověďmi uvedenými v dotazníku. V grafech pro jednotlivé oblasti je vidět, že touto jednoduchou a levnou metodou jakou



je spektrofotometrické stanovení, lze odlišit aktivního kuřáka, nekuřáka i pasivního kuřáka. V některých případech se pasivní kuřáci a nekuřáci obsahem kotininu překrývají. To je dáno prostředím ve kterém se před odběrem dárci vyskytovali, mírou pasivního kouření, rychlostí metabolismu i subjektivním posouzením co pasivní kouření je a co nikoliv. Přehled získaných výsledků uvádím v grafech (Obr. 4.3 a-e). Jednotlivé experimentální body v grafech jsou pro lepší přehlednost a orientaci.



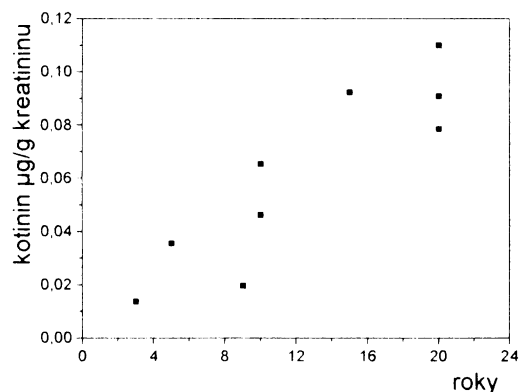


Obr. 4.3 a-e Přehled výsledku stanovení kotininu pro jednotlivé oblasti

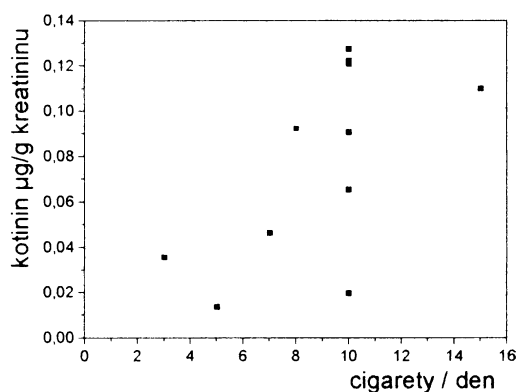
#### 4.2.1 Vliv délky kouření a počtu vykouřených cigaret denně na množství kotininu v moči

Při zpracovávání získaných dat jsem se zaměřila na ověření předpokladu, že délka kouření a počet vykouřených cigaret ovlivňuje množství kotininu v moči. Opět jsem čerpala z dotazníků jednotlivých dárců. Ve všech lokalitách se prokázalo, že množství cigaret a délka kouření zvyšuje množství kotininu v moči. Získané výsledky uvádím v následujících grafech: (Obr. 4.4 – 4.8)

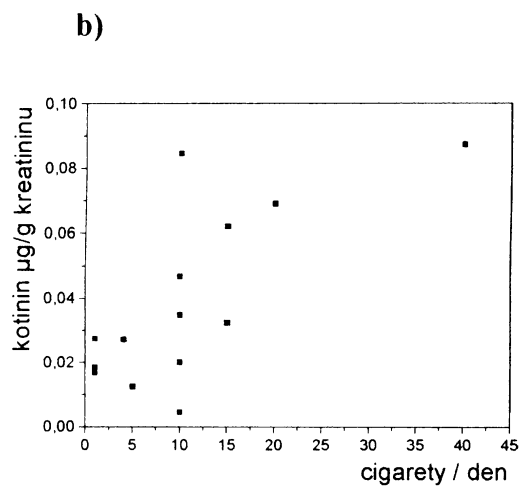
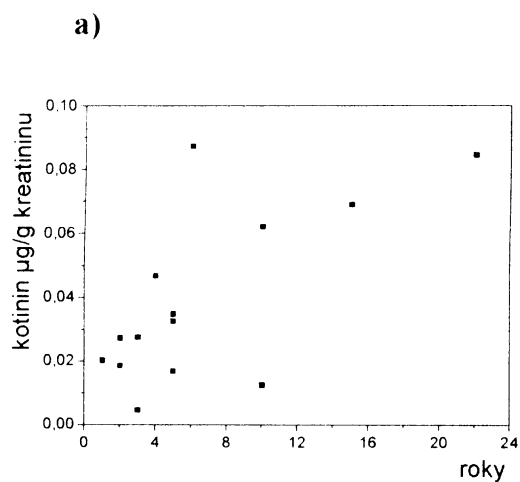
a)



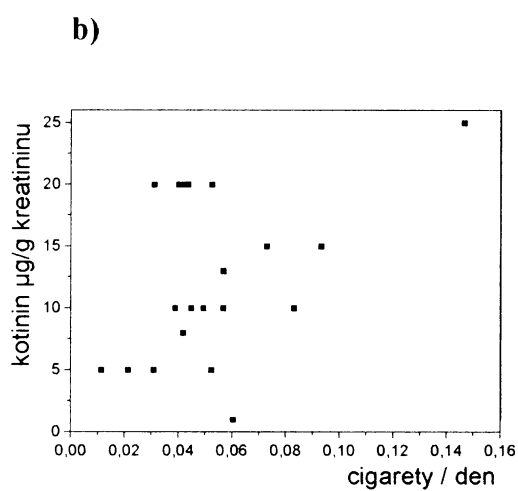
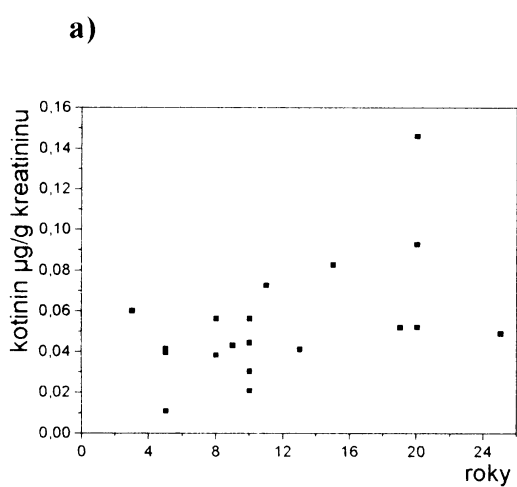
b)



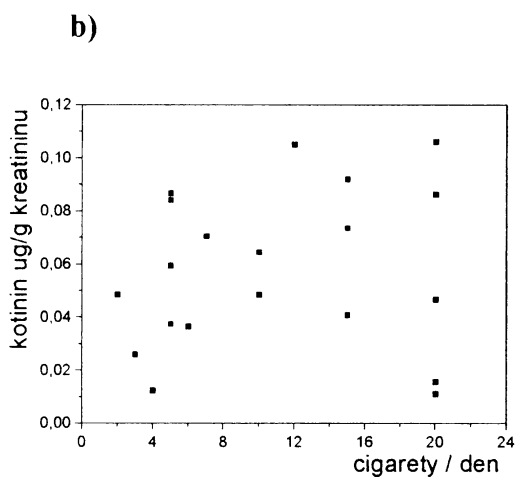
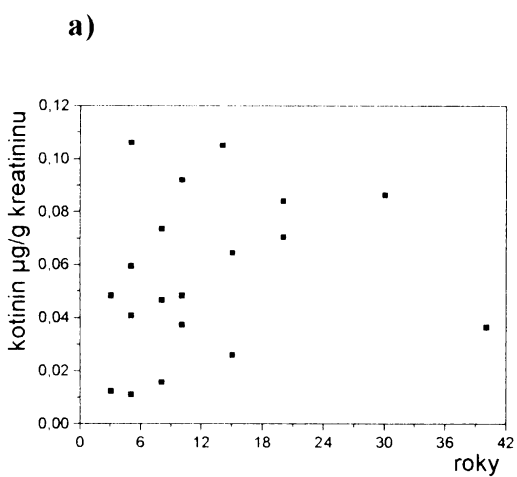
Obr. 4.4. Kroměříž: a) roky, b) cigarety den



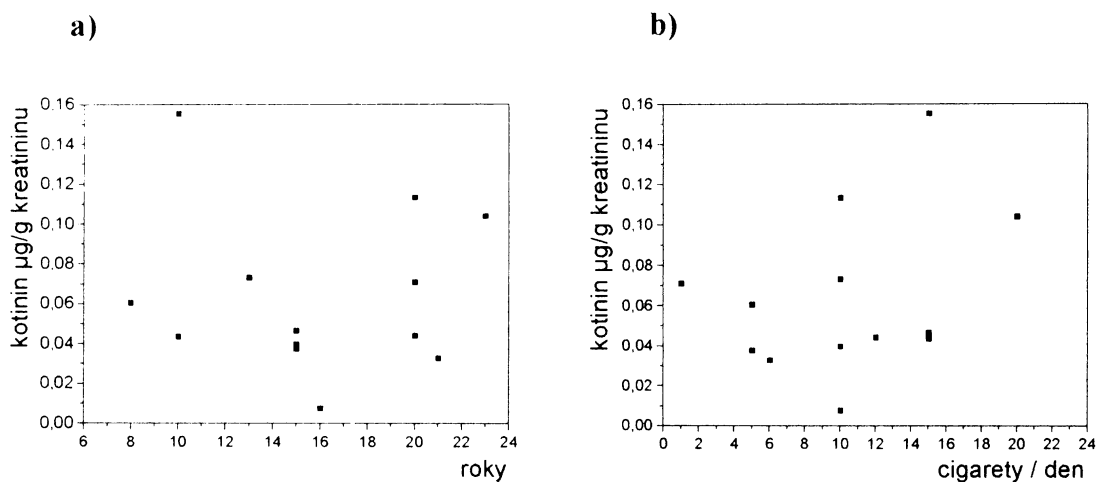
Obr. 4.5. Liberec: a) roky, b) cigarety den



Obr. 4.6. Ostrava: a) roky, b) cigarety den



Obr. 4.7. Praha: a) roky, b) cigarety den



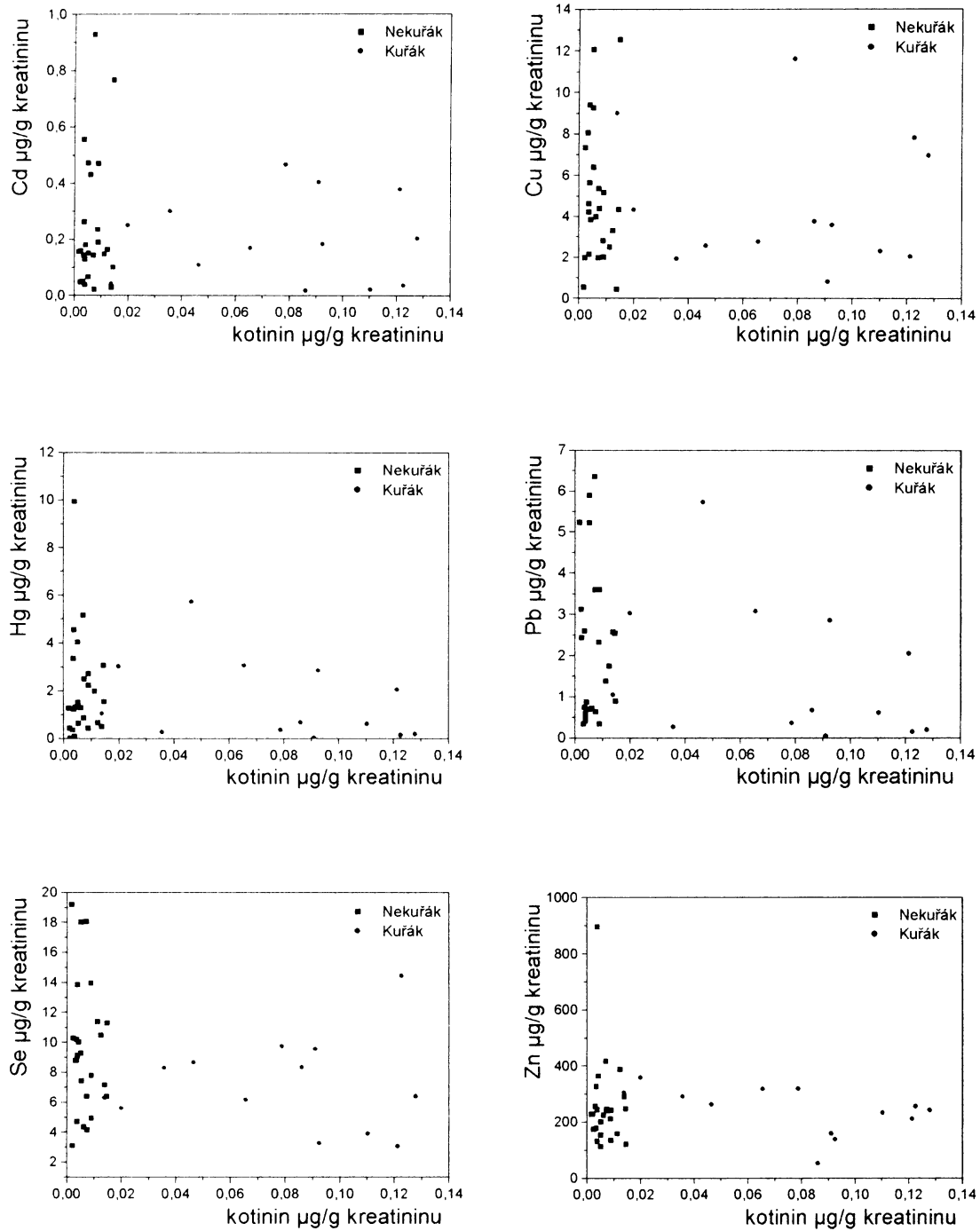
Obr. 4.8. Uherské Hradiště: a) roky, b) cigarety den

V jednotlivých grafech je patrná závislost množství kotininu na počtu vykouřených cigaret denně i na délce kouření v letech. Se stoupajícím počtem cigaret za den nebo s délkou kouření v letech dochází ke zvyšování množství kotininu v moči.

### 4.3 Obsah stopových prvků

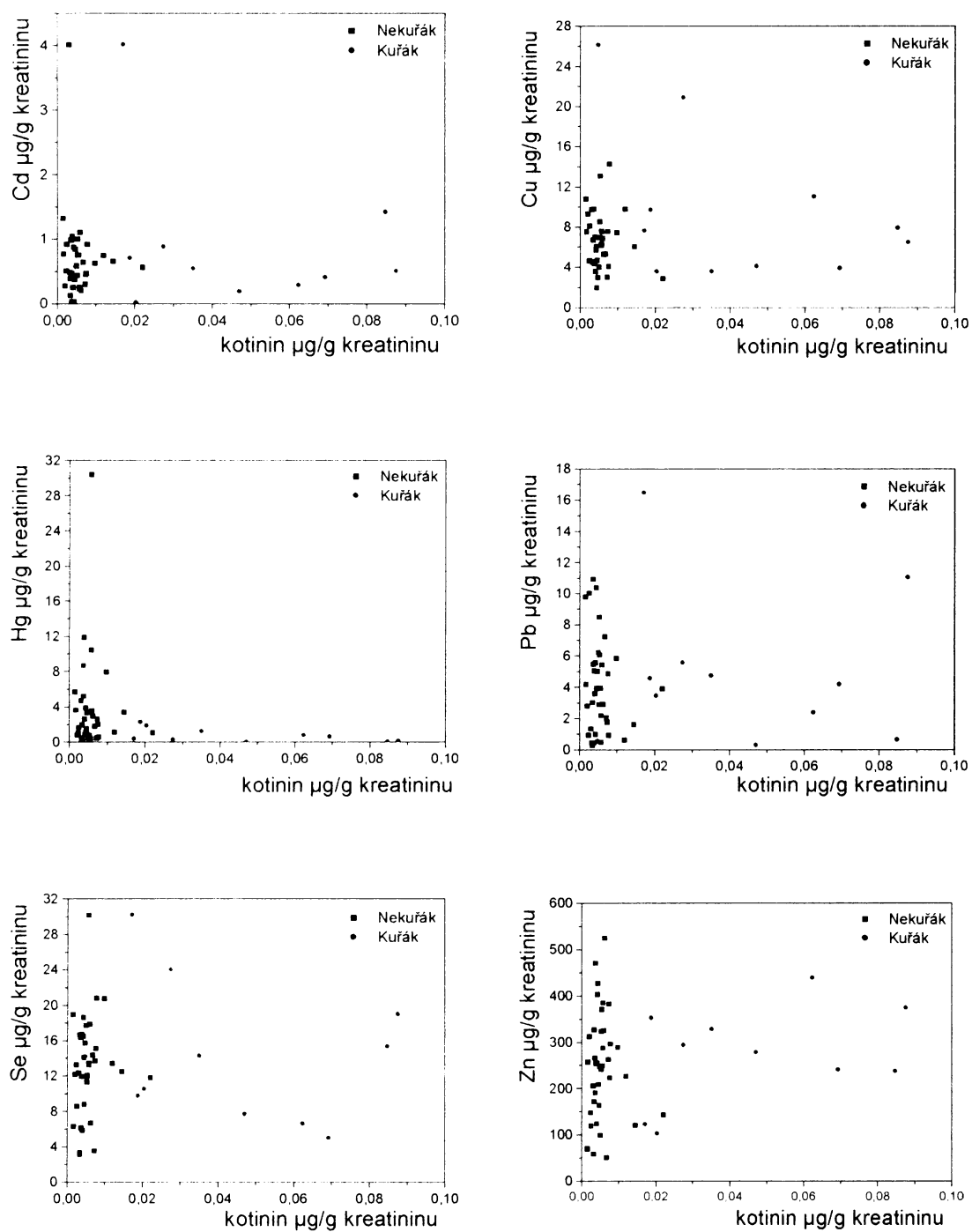
Výsledky analýzy stopových prvků jsou pro jednotlivé oblasti až na malé rozdíly stejné. Zvýšené hodnoty u některých dárců mohou být způsobeny profesionální expozicí, místem bydliště, stravovacími návyky apod.. Z grafů vyplývá, že žádný z měřených prvků, kromě zinku, nevykazuje statisticky významné rozdíly svého obsahu v moči v závislosti na tom, zda se jedná o kuřáka či nekuřáka. Nelze tedy říci, že obsah stopových prvků obsažených v moči zásadním způsobem charakterizují kuřáka či nekuřáka. Množství stopových prvků obsažené v moči kuřáka a nekuřáka pro jednotlivé oblasti jsou znázorněny v následujících grafech. (Obr. 4.9 – Obr. 4.13)

## Kroměříž



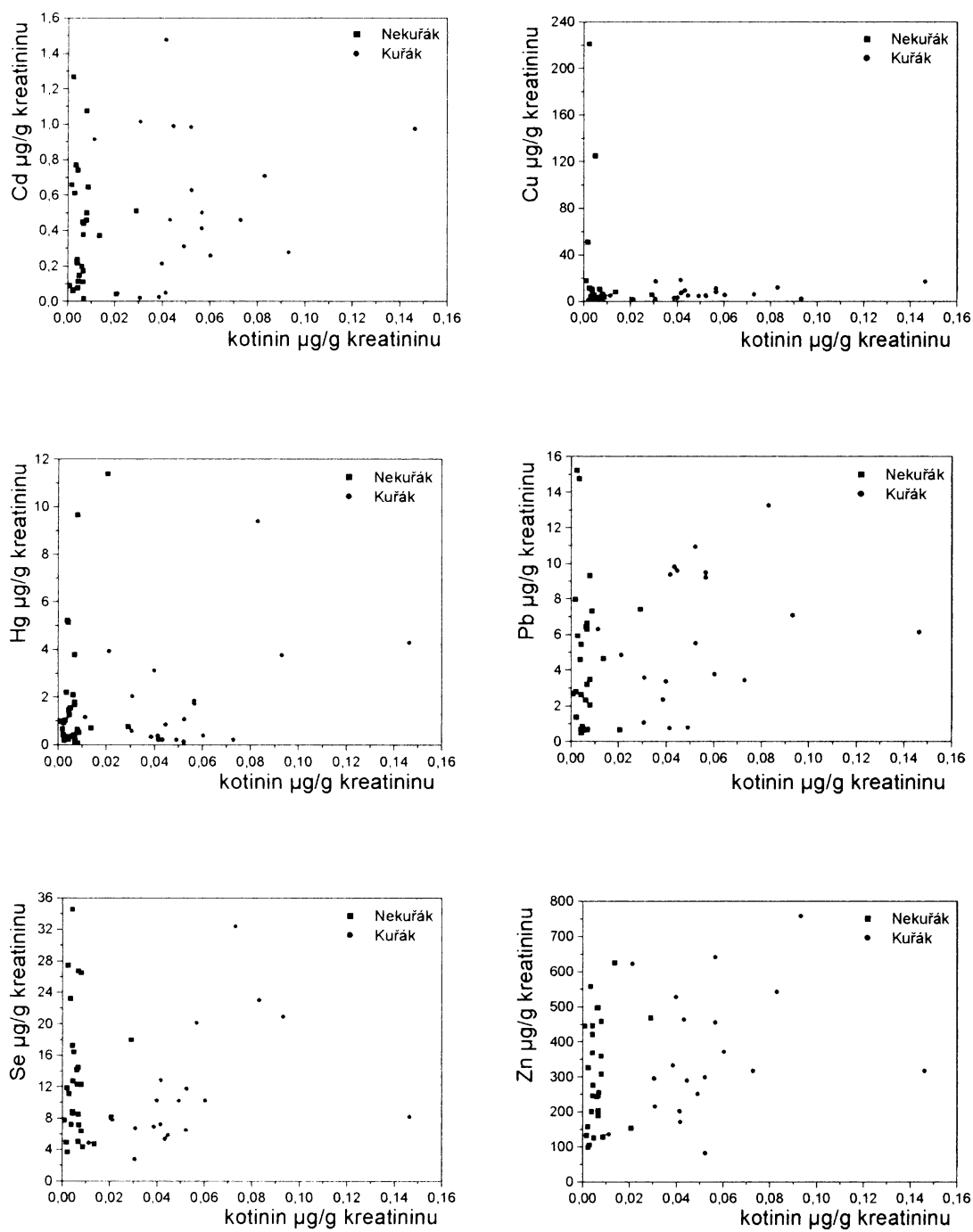
Obr. 4.9. Korelace mezi obsahem stopových prvků v moči dárců a obsahem kofeinu u dárců z Kroměříže

## Liberec



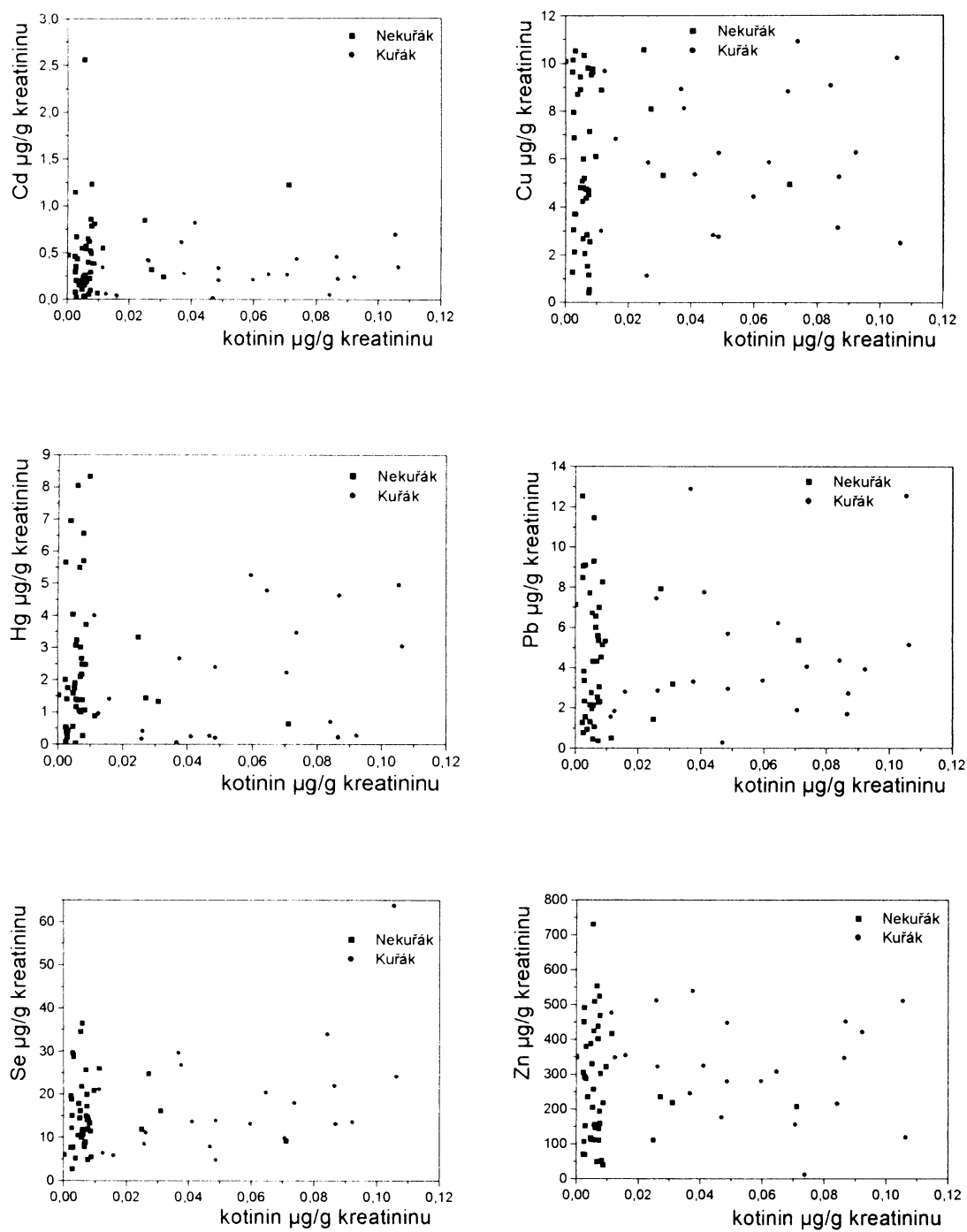
Obr. 4.10 Korelace mezi obsahem stopových prvků v moči dárců a obsahem kotininu u dárců z Liberce

# Ostrava



Obr. 4.11 Korelace mezi obsahem stopových prvků v moči dárců a obsahem kotininu u dárců z Ostravy

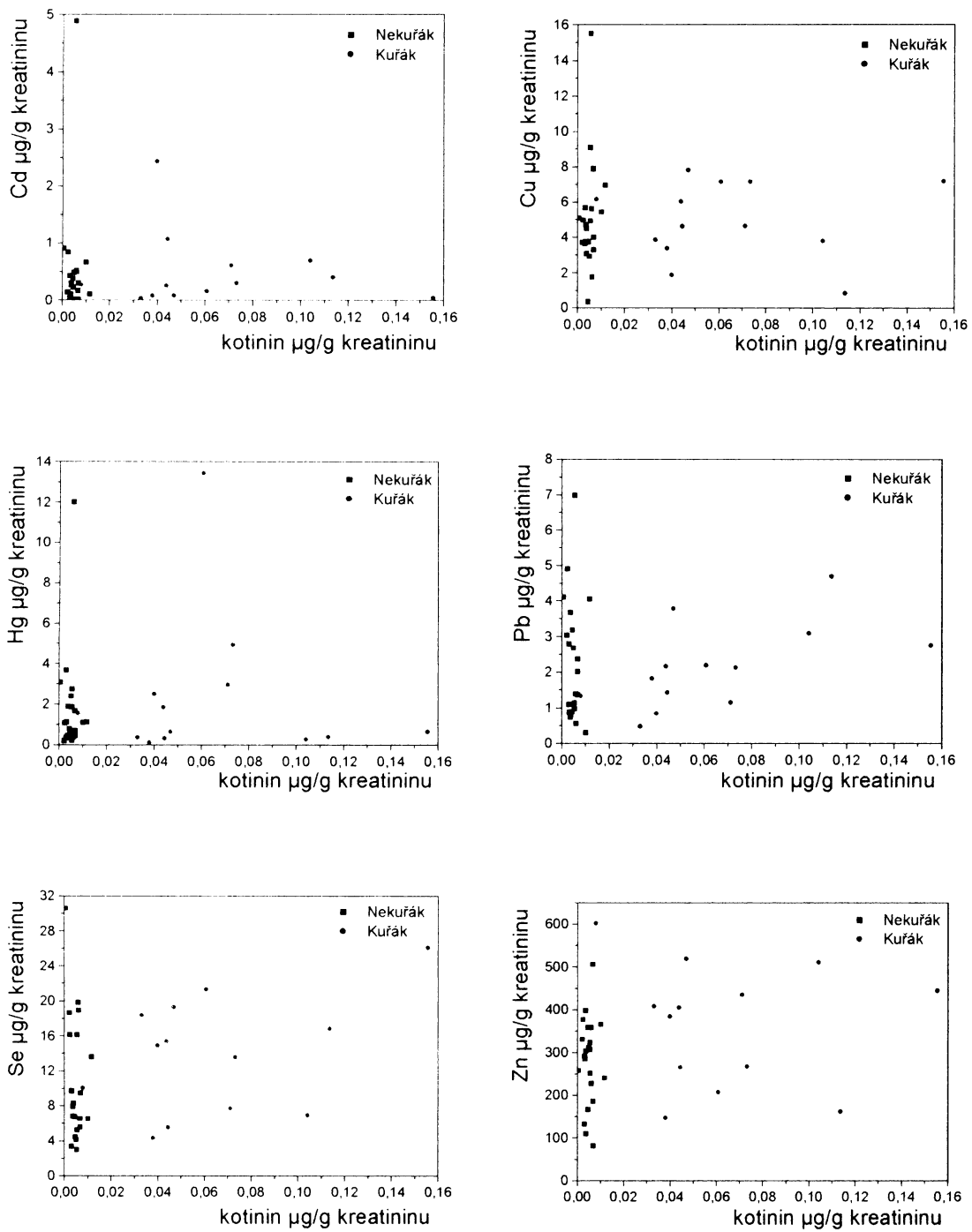
## Praha



Obr. 4.12 Korelace mezi obsahem stopových prvků v moči dárců a obsahem kotininu u dárců z Prahy



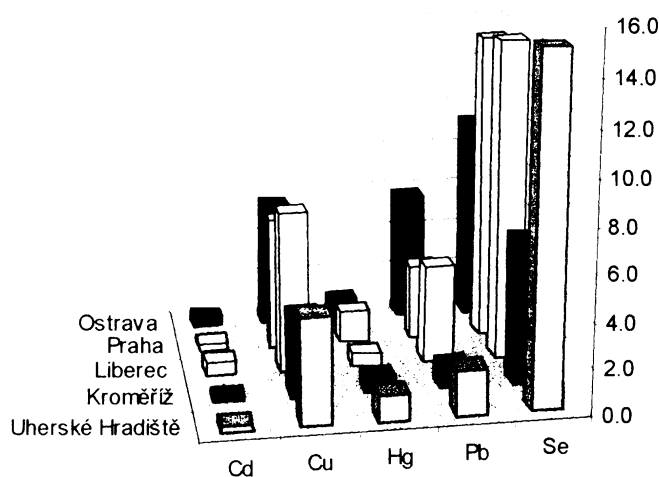
## Uherské Hradiště



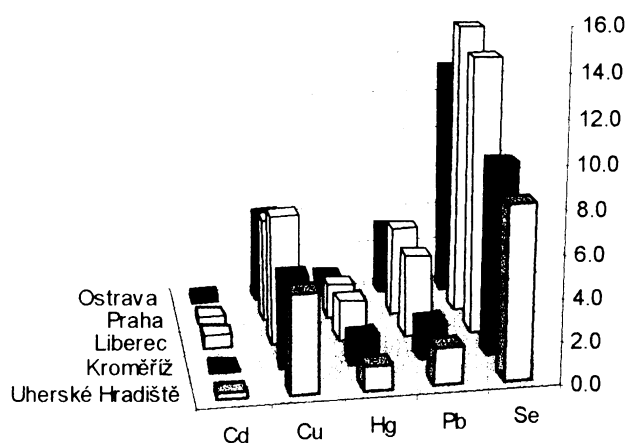
Obr. 4.13 Korelace mezi obsahem stopových prvků v moči dárců a obsahem kofeinu u dárců z Uherského Hradiště

### 4.3.1 Zpracování získaných obsahů jednotlivých stanovovaných stopových prvků v moči dárců

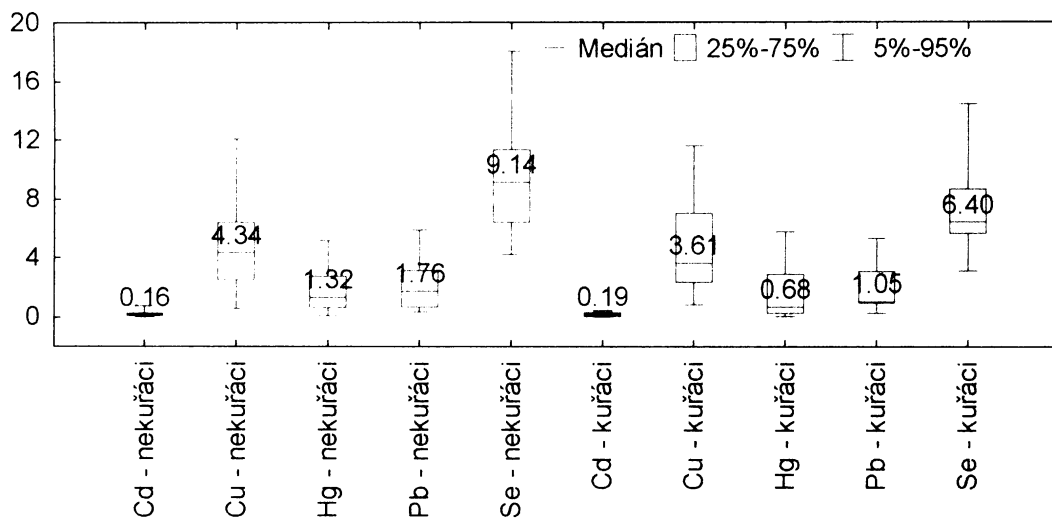
V souhrmných grafech neuvádím hodnoty zinku, a to jedině z důvodu řádově jiných výsledných obsahů než mají ostatní prvky. Zinku je věnována samostatná kapitola (Kap. 4.3.3.). V následujících grafech jsou zpracovány a porovnány získané obsahy jednotlivých stopových prvků v moči kuřáků a nekuřáků. (Obr. 4.14 – 4.20)



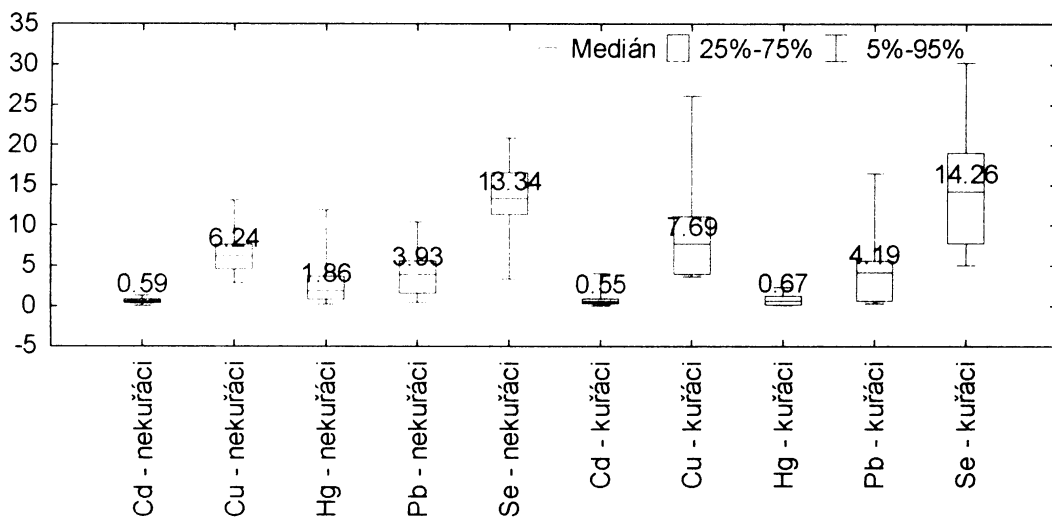
Obr. 4.14 Kuřáci



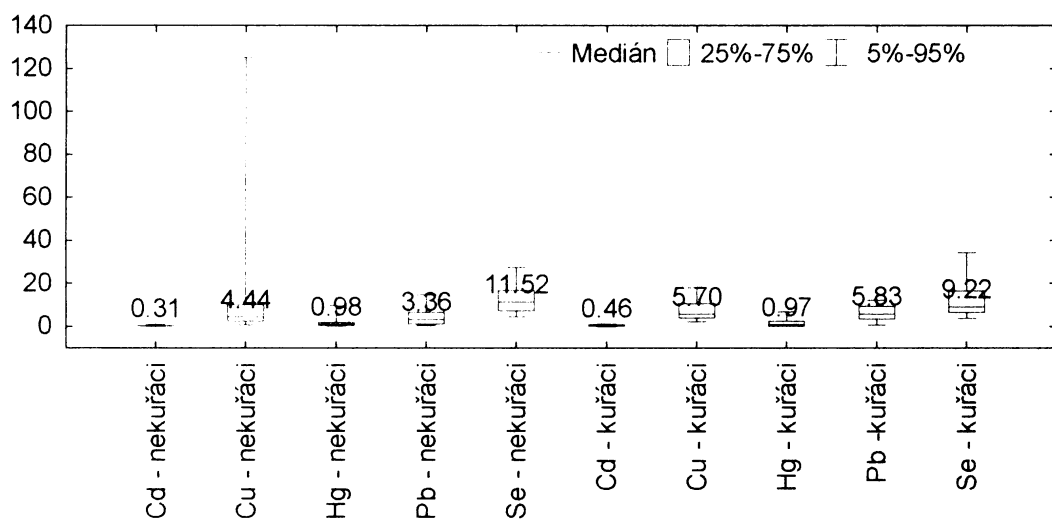
Obr. 4.15 Nekuřáci



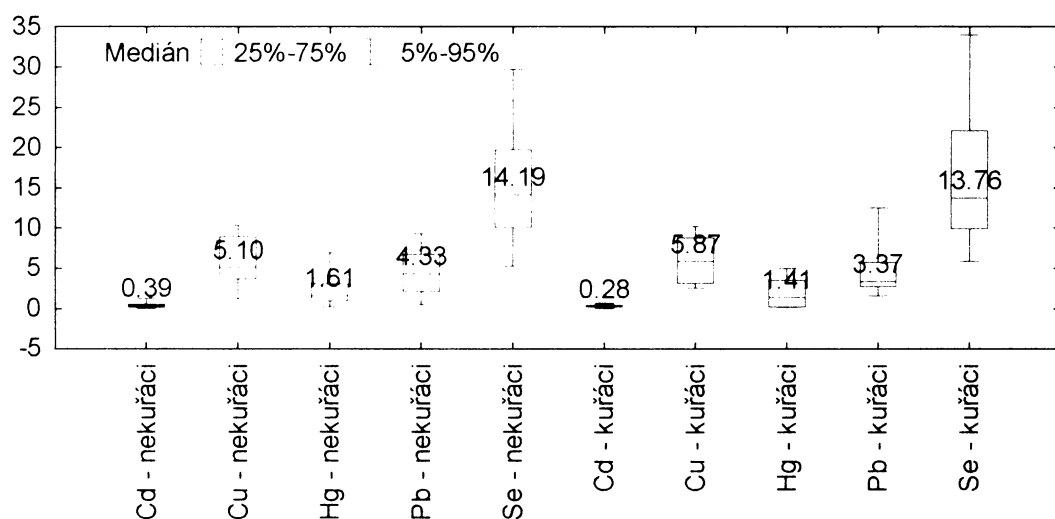
Obr. 4.16 Kroměříž



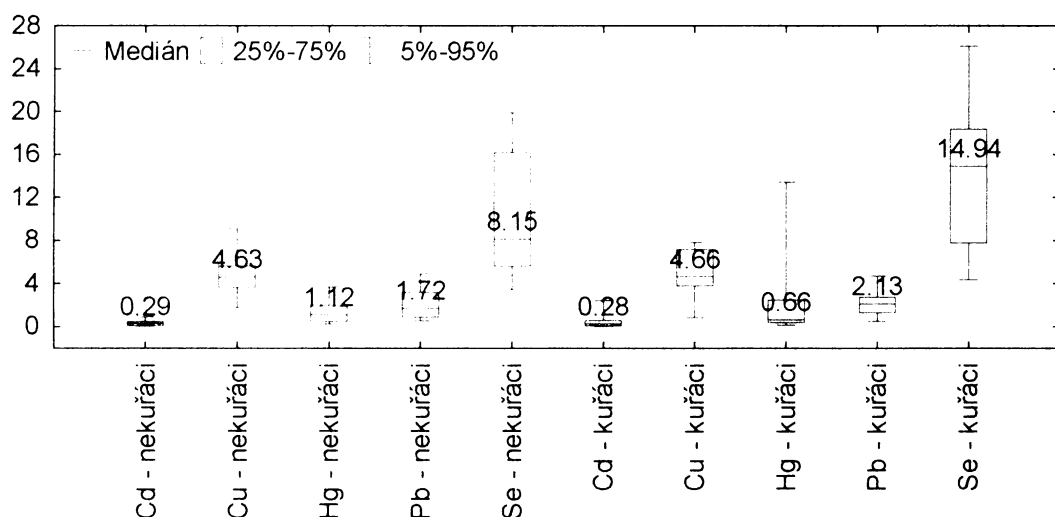
Obr. 4.17 Liberec



Obr. 4.18 Ostrava



Obr. 4.19 Praha



Obr. 4.20 Uherské Hradiště

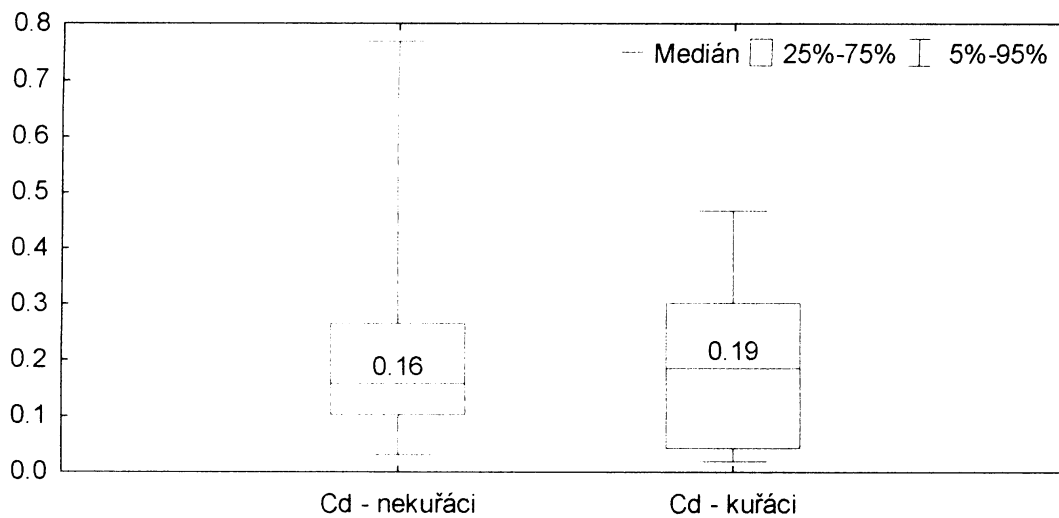
Ze souhrnných grafů vyplývá, že obsah stopových prvků se významně neliší u kuřáků či nekuřáků. Jediným prvkem, u kterého jsou rozdílné hodnoty u kuřáků a nekuřáků, je zinek, kterému je věnována samostatná kapitola (Kap. 4.3.3.). Lze tedy říci, že množství stopových prvků v organismu, není ovlivňováno tím, zda jedinec kouří či nikoliv.

#### 4.3.2 Kadmium

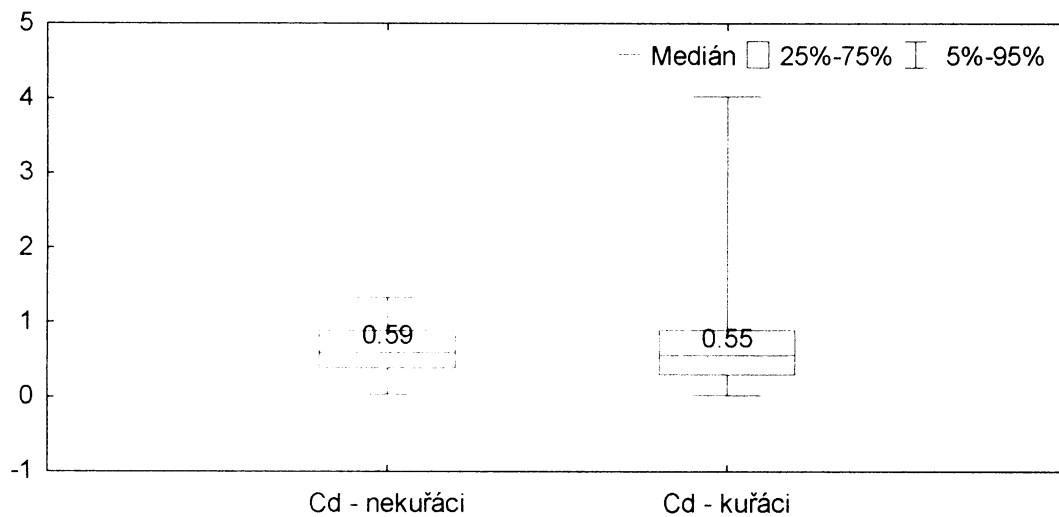
Nejvíce diskutovaným prvkem, pokud se týká kouření, je kadmium, a proto jsem se na tento prvek zaměřila. Hlavní expoziční cestou kadmia pro populaci je, vedle

profesionální expozice, příjem potravou a kouřením (příjem 1 cigaretou je 0.1 – 0.2 mg Cd). Resorpce kadmia střevní stěnou je 20 – 50 %. Absorbované kadmium je krví transportováno do jater, kde je vázáno hlavně na metalothionein, částečně na glutathion a část přechází do ledvin. Játra a ledviny ukládají poměrně značná množství kadmia (až desítky mg. kg<sup>-1</sup>). Malé množství kadmia cirkulujícího v organismu je vylučováno močí.

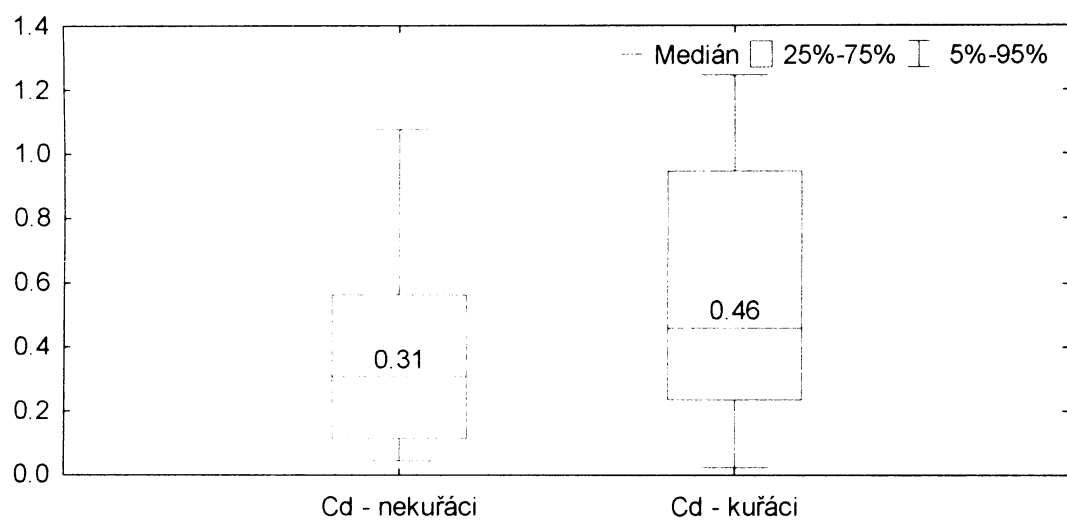
Přehled výsledků obsahu kadmia v moči dárců v jednotlivých oblastech uvádím v následujících grafech (Obr. 4.21– 4.25)



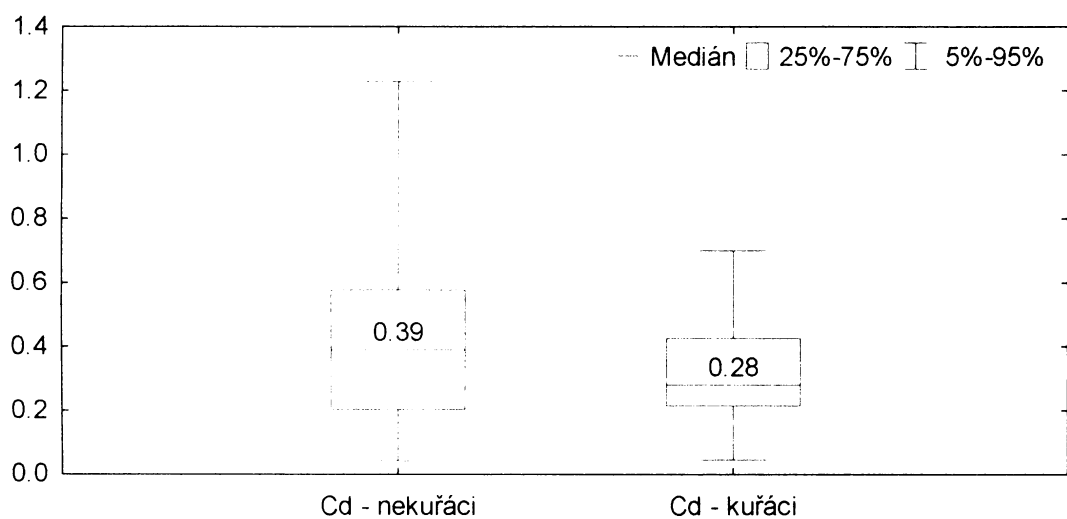
Obr. 4.21 Kroměříž



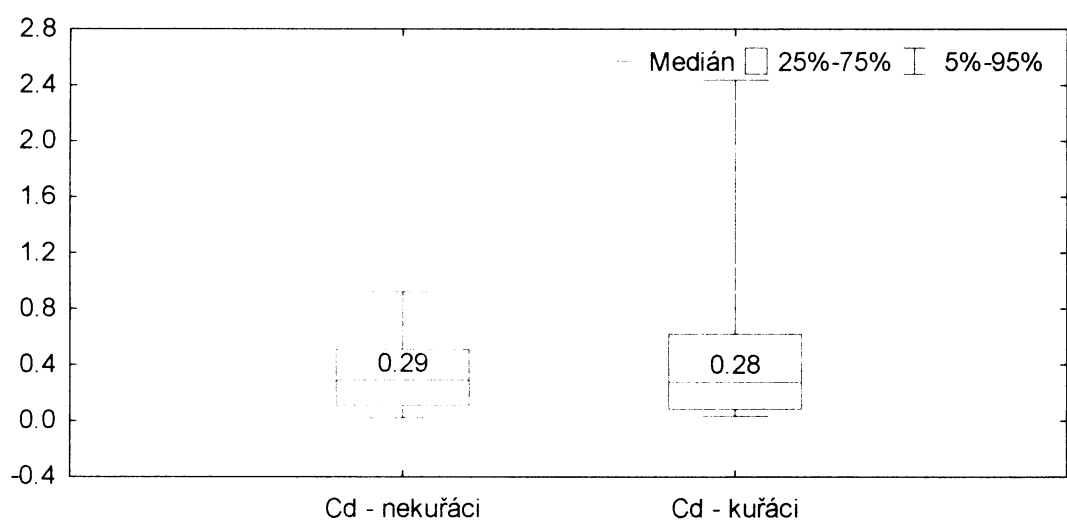
Obr. 4.22 Liberec



Obr. 4.23 Ostrava



Obr. 4.24 Praha

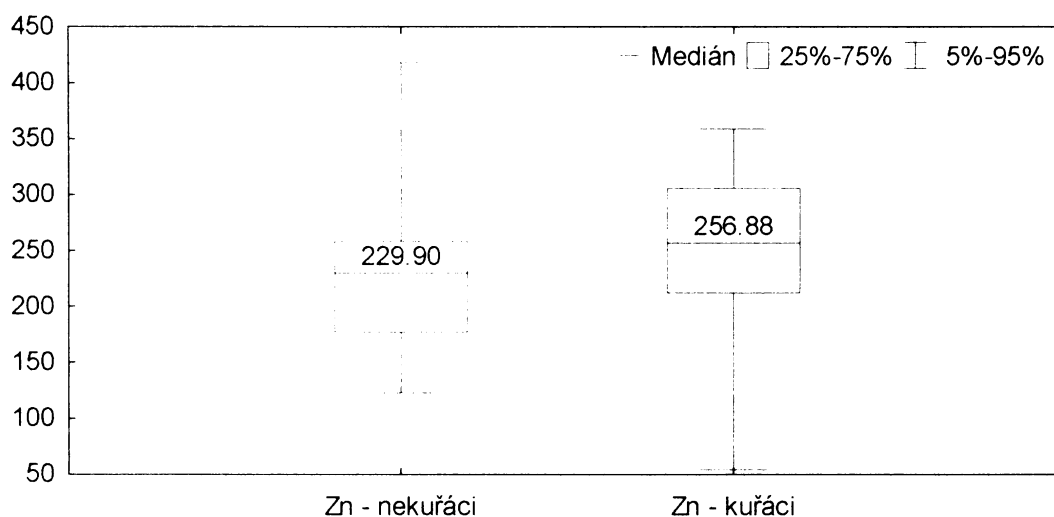


Obr. 4.25 Uherské Hradiště

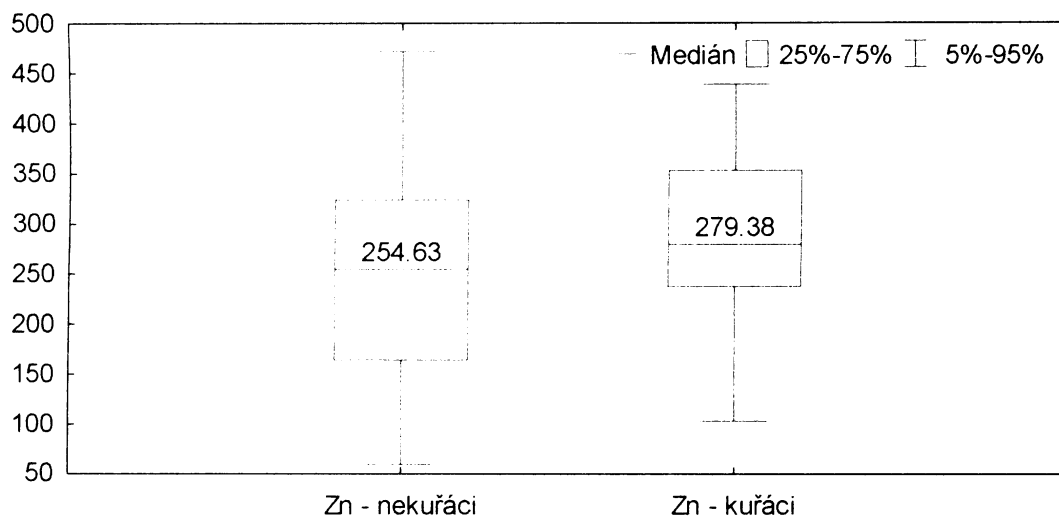
Ze získaných výsledků nelze jednoznačně říci, že kouření zvyšuje množství kadmia v moči. V některých oblastech mají více kadmia v moči kuřáci, v jiných nekuřáci. Z toho vyplývá, že obsah kadmia v moči, není vhodným bioindikátorem pro kouření. Vhodnějším způsobem by bylo analyzování množství kadmia v krvi, kde z dříve publikovaných výsledků vyplývá, že kuřáci mají obecně v krvi více kadmia než nekuřáci. [14]

#### 4.3.3 Zinek

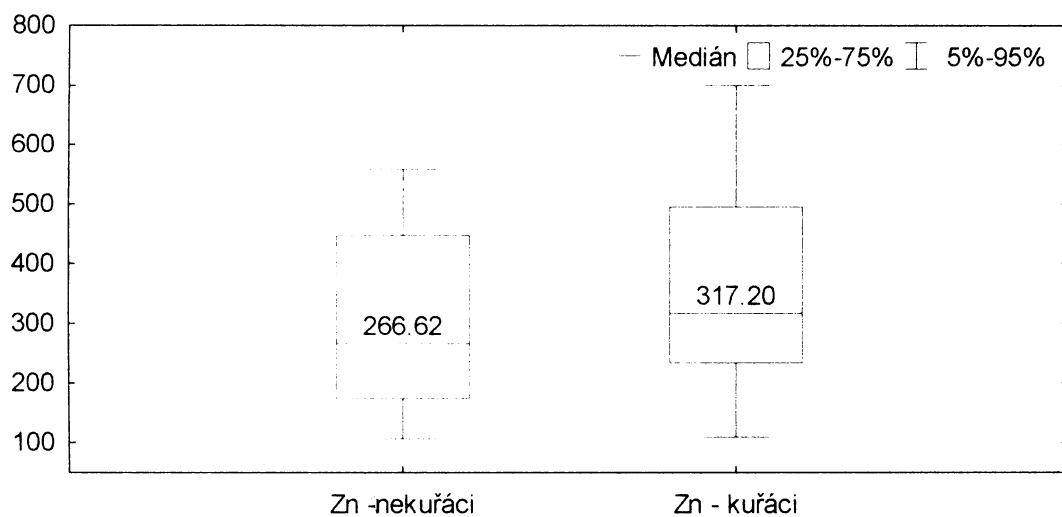
Jediný prvek, u kterého byl viditelný rozdíl v obsahu v moči u kuřáků a nekuřáků, je zinek. V moči nekuřáků je zinku méně než u kuřáků. Kouření, alkoholické nápoje a stres, jsou hlavní faktory, které způsobují velké vylučování a tedy i ztráty zinku z organismu. Zinek potlačuje toxicitu kadmia, které se podílí na vzniku vysokého krevního tlaku, hlavně u kuřáků, kdy se kadmium v těle hromadí a kuřáci jsou tak více náchylní k vysokému tlaku. Pokud je tedy zinek nadměrně vylučován z těla, což i ze získaných výsledků obsahu v moči vyplývá, nedochází tak k účinnému potlačování toxicity kadmia v těle kuřáků a tím ke snižování krevního tlaku. Přehled získaných výsledků uvádím v grafech (Obr. 4.26 - 4.30).



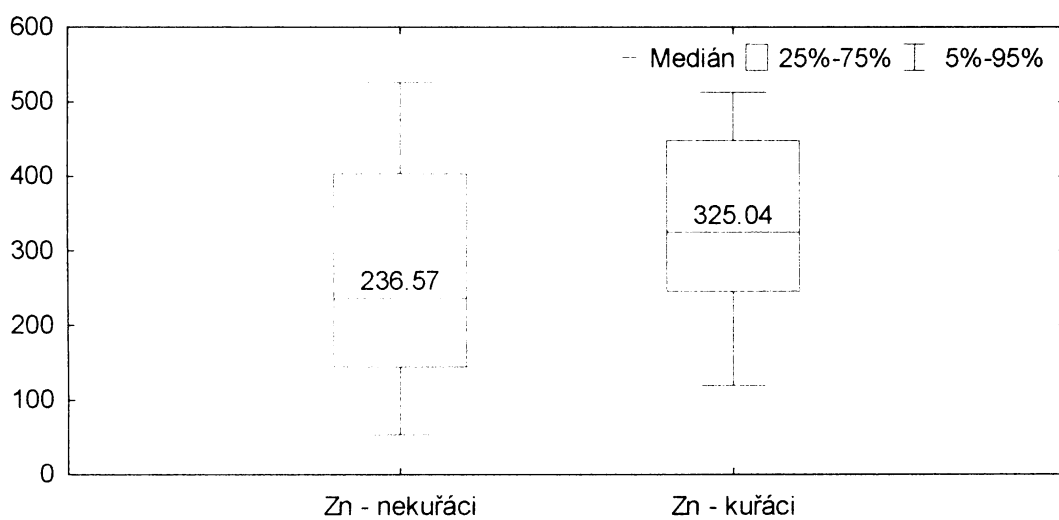
Obr. 4.26 Kroměříž



Obr. 4.27 Liberec

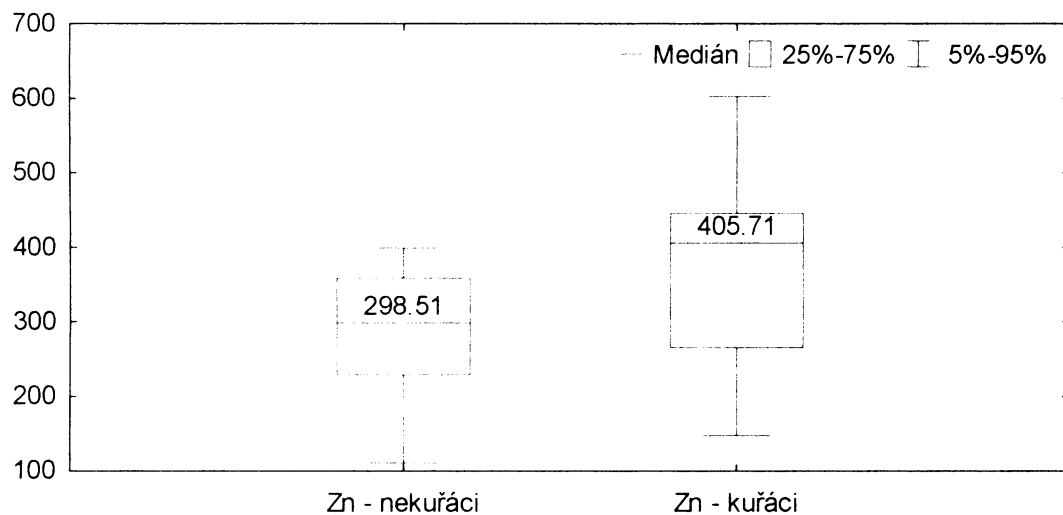


Obr. 4.28 Ostrava



Obr. 4.29 Praha





Obr. 4.30 Uherské Hradiště

Z výše uvedených grafů je patrné, že množství zinku v moči u kuřáků je vyšší než u nekuřáků. Zinek je prvek esenciální, a jeho veliké vylučování z organismu je jev nežádoucí. Vylučováním zinku z organismu nedochází ke snižování toxicity kadmia a tím ke snižování krevního tlaku.

## 5. Závěr

Cílem této práce bylo ověřit správnost odpovědí, týkajících se kouření, dle dotazníku, které každý dobrovolný dárce vyplňoval (viz Experimentální část – Obr.3.1). Ze získaných výsledků plyne, že spektrofotometrické stanovení kotininu v moči je vhodnou metodou k tomuto ověření. Oproti jiným analytickým metodám (kapalinová a plynová chromatografie, imunologické metody) má tento způsob stanovení mnoho výhod. Jedná se o levnou, poměrně jednoduchou metodu umožňující stanovení většího počtu vzorků za den. Tato metoda je dostatečně citlivá a selektivní. Kotinin je vhodným indikátorem kouření, 70% nikotinu je přeměněno na kotinin a 10-15% je vyloučeno v nezměněné formě. Vhodnějším způsobem by bylo stanovení kotininu z krve, ale z praktické stránky je odebrání moče výhodnější. Jedná se o neinvazivní způsob odběru a není potřeba školený personál. Metoda poskytuje kvalitativní i kvantitativní důkaz kuřáctví. Barevná reakce, dokazující přítomnost kotininu ve vzorku, je rychlá a snadno vyhodnotitelná. Průměrné hodnoty kotininu v moči nekuřáků jsou 0.0066  $\mu\text{g/g}$  kreatininu, u pasivních kuřáků pak 0.0076  $\mu\text{g/g}$  kreatininu a u kuřáků 0.0572  $\mu\text{g/g}$  kreatininu.

Byla také prokázána závislost množství kotininu na počtu vykouřených cigaret denně i na délce kouření v letech. Se stoupajícím počtem cigaret za den nebo s délkou kouření v letech dochází ke zvyšování množství kotininu v moči.

Množství stopových prvků se významně liší pouze u zinku. Ostatní sledované prvky nedokazují výraznou závislost na tom, zda je člověk kuřák či nikoliv.

Zinku je v moči kuřáků více než u nekuřáků. Je to dané tím, že kouření je jedním z hlavních faktorů (spolu s pitím alkoholických nápojů a stresem), které zvyšují vylučování zinku z organismu.

Jedním z velmi diskutovaných prvků, v souvislosti s kouřením, je kadmium. Výsledky stanovení kadmia v moči dokazují, že je z organismu vylučováno ve velmi malém množství (méně než 1% podané dávky). Dochází k jeho kumulování v játrech a ledvinách a tím se pro organismus stává toxickým. Biologický poločas kadmia v těle člověka je 15 – 30 let.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] Šnajdrová, A.; Zdravotní ústav Frýdek-Místek. Dostupné z URL:  
<<http://www.zuova.cz/informace/opz017.php>> [cit 10.1.2006]
- [2] Kozák, J. a kolektiv; *Rizikový faktor kouření*. KPK Praha 1993.
- [3] Nicotiana tabacum. Dostupné z URL: <http://www.biotox.cz/enpsyro/pj3mic.html>  
[cit 13.1.2006]
- [4] Lékařská fakulta Masarykovy univerzity. *Kouření a zdraví*. Dostupné z URL:  
<[www.med.muni.cz/to.cs/predmety/preventivni/prevFSPS/SportKour.html](http://www.med.muni.cz/to.cs/predmety/preventivni/prevFSPS/SportKour.html)>  
[cit 7.3.2006]
- [5] Sovinová, H., Sadílek, P., Csémy, L., *Vývoj prevalence kuřáctví v dospělé populaci  
ČR*. Dostupné z URL: <[www.szu.cz/dokumenty.html](http://www.szu.cz/dokumenty.html)> [cit 14.3.2006]
- [6] *Složení tabákového kouře*. Dostupné z URL:  
<[http://www.dokurte.cz/?stranka=slozeni\\_tabakoveho\\_koure&typ=sablony](http://www.dokurte.cz/?stranka=slozeni_tabakoveho_koure&typ=sablony)>  
[cit 5.1.2006]
- [7] Baláková, L., *Expozice a závislost mladistvých kuřáku na nikotinu*. Dizertační práce.  
Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství, Brno 2003
- [8] Nikotin. Dostupné z URL:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Nicotine\\_chemical\\_structure.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Nicotine_chemical_structure.png) [cit 22.3.2006]
- [9] Velišek, J., *Chemie potravin 3*. OSSIS Tábor 1999

[10] Kotinin. Dostupné z URL:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/FLUKA/27699>

[cit 22.3.2006]

[11] *Blood Lead and Cadmium, Blood Total Mercury, Blood Inorganic Mercury, RBC folate, Serum folate, Methylmalonic acid, Vitamin B12, Ferritin, Homocysteine, Urinary Mercury, and Cotinine.* NHANES 2001–2002 March 2005 Data Release Documentation for Laboratory Results

Dostupné z URL:

<[http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes\\_01\\_02/106\\_b\\_doc.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_01_02/106_b_doc.pdf)> [cit 6.1.2006]

[12] *Haaranalyse in der Umweltmedizin.* Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 2005 48:246-250

[13] SOP č.7 Státní zdravotní ústav Praha, CHŽP, laboratoř biochemie a stopových prvků

[14] Odborná zpráva za období 1994-2004 „Zdravotní důsledky expozice lidského organismu toxickým látkám ze zevního prostředí“ SZU – 2005

[15] Čejchanová, M., Spěváčková, V., Černá, M., Batářiová, A., Šmíd, J., Beneš, B., *Hladiny vybraných stopových prvků u nezatížené populace v ČR – 10 let biologického monitoringu.* Mikroelementy 2004 – sborník přednášek

[16] Bencko, V., Cikrt, M., Lener, J., *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka.* 2.přepracované vydání, Grada Publishing, Praha 1995

[17] Němcová, I., Čermáková, L., Rychlovský, P., *Spektrofotometrické analytické metody I.* 2.vydání, Karolinum Praha 2004