

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



VÝVOJ A VALIDACE HPLC METODY PRO STANOVENÍ NIKOTINU
V ÚSTNÍM SPREJI A V NÁPLNÍCH DO ELEKTRONICKÝCH CIGARET

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Marcela Maťátková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Marcela Matátková

Ráda bych poděkovala PharmDr. Lucii Havlíkové, Ph.D. za odborné vedení, za poskytnutí cenných rad při zpracování zadaného tématu diplomové práce a za čas, který mi věnovala.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Marcela Mařátková

Školitel: PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení nikotinu v ústním spreji a v náplních do elektronických cigaret

Cílem této diplomové práce byl vývoj a validace HPLC metody pro stanovení nikotinu v ústním spreji a v náplních do elektronických cigaret.

Při vývoji se vycházelo z dostupných metod zabývajících se HPLC analýzou nikotinu a jeho příbuzné látky kotininu. Optimální podmínky byly nalezeny na koloně XTerra[®]MS C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μm) s mobilní fází acetonitril : 10mM octan amonný pH 9 (20 : 80, v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, vlnová délka detektoru byla nastavena na 260 nm a jako vnitřní standard byl zvolen trimetoprim. Za těchto podmínek jsou nikotin, kotinin a trimetoprim odděleny do 5 minut.

Při analýze ústního spreje a vybraných náplní do elektronických cigaret je stanovení kotininu rušeno pomocnými látkami v přípravcích. Vypracovaná HPLC metoda byla proto validována pouze pro stanovení nikotinu. Závěry z validace prokázaly, že tato metoda poskytuje přesné a správné výsledky a je tedy vhodná pro daný účel.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Marcela Matátková

Supervisor: PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Development and validation of HPLC method for the determination of nicotine in spray and in e-cigarette cartridges

The aim of this diploma thesis was the development and validation of HPLC method for the determination of nicotine in mouth spray and in e-cigarette cartridges.

The development was based on available methods that deal with HPLC analysis of nicotine and its related compound cotinine. The optimum conditions were found using XTerra[®]MS C18 column (100 x 4.6 mm, 3.5 μ m) with mobile phase acetonitrile : 10mM ammonium acetate pH 9 (20 : 80, v/v). The flow-rate was 1 ml/min and the wavelength of the detector was set up at 260 nm. Trimethoprim was used as an internal standard. Under these conditions nicotine, cotinine and trimethoprim were separated within 5 minutes.

It was impossible to determine cotinine in the analysis of mouth spray and chosen electronic cigarette cartridges due to coelution of used excipients. Therefore the developed HPLC method was validated and system suitability parameters were evaluated only for nicotine. The results of validation demonstrated, that the method provides precise and accurate results and it is suitable for its intended purpose.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíl a popis zadání práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC	11
3.1.1. Kapalinový chromatograf	11
3.1.2. Chromatografické kolony	12
3.1.3. Mobilní fáze	12
3.1.4. Detektory	13
3.2. Validace analytických metod	14
3.2.1. Validační parametry	14
3.3. Nikotin	16
3.3.1. Farmakologické vlastnosti nikotinu	16
3.4. Kotinin	17
3.5. Následky kouření tabáku	18
3.5.1. Poškození nikotinem	18
3.5.2. Poškození tabákovým kouřem	18
3.6. Náhradní nikotinová terapie	19
3.7. Nikotinový ústní sprej	20
3.7.1. Přípravek Nicostar	21
3.7.1.1. Složení přípravku	21
3.7.1.2. Použití	21
3.8. Elektronická cigareta	22
3.8.1. Kategorizace elektronických cigaret	22
3.9. HPLC metody zabývající se stanovením nikotinu a kotininu	24

4. Experimentální část	26
4.1. Materiál	26
4.1.1. Vzorky	26
4.1.2. Chemikálie	26
4.1.3. Pomůcky a přístroje	26
4.2. Vývoj metody	27
4.3. Pracovní postup	27
4.3.1. HPLC sestava a podmínky separace	27
4.3.2. Příprava mobilní fáze	28
4.3.3. Příprava zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml)	28
4.3.4. Příprava zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/ 100 ml)	28
4.3.5. Příprava standardního roztoku (nikotin 7 mg/ 100 ml, kotinin 3,2 mg/ 100 ml, trimetoprim 4 mg/ 100 ml)	28
4.3.6. Příprava pracovního roztoku trimetoprimu (25 mg/100 ml) pro stanovení linearitu	28
4.3.7. Příprava pracovního roztoku nikotinu (35 mg/100 ml) pro stanovení linearitu	29
4.3.8. Příprava pracovního roztoku kotininu (15 mg/100 ml) pro stanovení linearitu	29
4.3.9. Příprava vzorku Nicostar	29
4.3.10. Příprava vzorku Tobacco Blue	29
4.3.11. Příprava vzorku Desert Ship	29
4.3.12. Příprava vzorku Nicostar pro stanovení parametru správnosti	30
4.3.13. Příprava vzorku Tobacco Blue pro stanovení parametru správnosti	30
4.3.14. Příprava vzorku Desert Ship pro stanovení parametru správnosti	30
4.3.15. Příprava roztoků pro stanovení parametru linearitu	30
4.3.16. Stanovení obsahu nikotinu ve vzorcích	31

5. Výsledky a diskuze	33
5.1. Optimalizace metody	33
5.1.1. Výběr stacionární a mobilní fáze	33
5.1.2. Výběr vnitřního standardu	39
5.2. Validace metody	40
5.2.1. Test vhodnosti chromatografického systému	40
5.2.1.1. Účinnost chromatografické kolony (počet pater) N	40
5.2.1.2. Faktor symetrie (A_s)	40
5.2.1.3. Rozlišení chromatografických píků (R_s)	41
5.2.1.4. Opakovatelnost analýzy	42
5.2.2. Validace analytické metody	43
5.2.2.1. Přesnost	43
5.2.2.2. Linearita	44
5.2.2.3. Správnost	47
5.2.2.4. Selektivita	49
5.2.2.5. Robustnost	51
6. Shrnutí závěrů práce	54
7. Seznam zkratk	55
8. Použitá literatura	56

1. Úvod

Nikotin, který patří mezi návykové látky, je obsažen v řadě komerčně dostupných produktů. V posledních letech vzrostla popularita elektronických cigaret. Množství nikotinu obsažené v náplních do elektronických cigaret však mnohdy neodpovídá hodnotám deklarovaným výrobcem.

Ke stanovení obsahu nikotinu je možné použít vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, která patří mezi nejužívanější metody v analytických laboratořích. Její nespornou výhodou je možnost jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzy.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je vývoj HPLC metody pro stanovení obsahu nikotinu a příbuzné látky kotininu a validace metody pro stanovení nikotinu v ústním spreji a v náplních do elektronických cigaret.

Základem experimentální části je optimalizace metody, výběr vnitřního standardu a následná validace. Teoretická část práce se zabývá popisem HPLC metody a validací analytických metod. Dále se věnuje nikotinu a kotininu, následkům kouření tabáku, náhradní nikotinové terapii a vybraným nikotinovým přípravkům (ústní sprej a elektronická cigareta).

3. Teoretická část

3.1. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

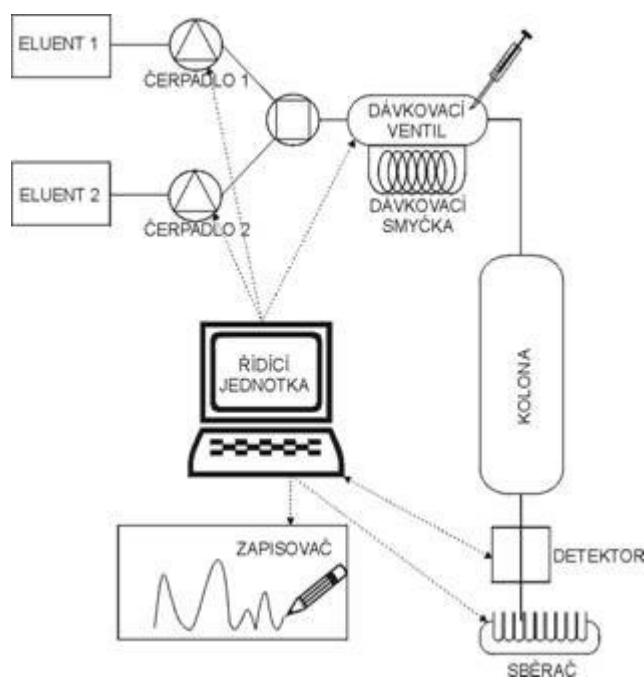
HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je široce využívaná separační metoda, která současně umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek směsi. Separace probíhá na koloně naplněné sorbentem na základě rozdílné interakce se stacionární a mobilní fází. Různé analyty jsou pak rozdílně zadržovány na koloně^{1,2}.

Mezi hlavní výhody HPLC metody patří rychlost a citlivost stanovení. Další předností je, že pro analýzu postačuje pouze malé množství vzorku a při využití automatického dávkovače je možno celou metodu automatizovat. HPLC metoda tedy nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Využívá se k identifikaci, stanovení obsahu a ke stanovení čistoty léčiv. Při správně zvolených chromatografických podmínkách lze z jednoho nástřiku analyzovaného vzorku zjistit všechny tyto informace současně. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se dále využívá při stabilitních studiích, kdy je možné sledovat postupný úbytek léčiva a zároveň kvalitativně i kvantitativně hodnotit rozkladné produkty¹.

3.1.1. Kapalinový chromatograf

Základní části kapalinového chromatografu jsou znázorněny na obr. 1.

Ze zásobníku je mobilní fáze konstantní průtokovou rychlostí čerpána vysokotlakým čerpadlem přes kolonu do detektoru. Před kolonou je umístěno dávkovací zařízení, které umožňuje nadávkovat na kolonu roztok vzorku. Nejdůležitější částí HPLC systému je kolona, ve které probíhá vlastní separace na jednotlivé složky, které jsou následně unášeny mobilní fází do detektoru. Vhodně upravený signál detektoru je poté přenášen do počítače, který zajišťuje sběr a zpracování dat^{1,3}.



Obrázek 1: Zjednodušené schéma kapalinového chromatografu⁴

3.1.2. Chromatografické kolony

Chromatografické kolony bývají dlouhé 5-30 cm o vnitřním průměru 2-8 mm a jsou zhotoveny z nerezové oceli nebo ze skla. Náplň kolony je tvořena sférickými částicemi sorbentů o velikosti 1,7-5 μm . Většina stacionárních fází je založena na bázi silikagelu, ale možné jsou i jiné látky (např. oxid hlinitý). Nejčastěji se používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, kdy jsou na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelu navázány různé radikály. Nejvíce zastoupené stacionární fáze jsou tzv. reverzní fáze. Jde o fáze s nepolárním charakterem, jejichž postranní řetězec je tvořen nejčastěji uhlovodíkovým řetězcem (např. C18 a C8). Běžně se užívají kolony plněné a testované přímo výrobcem, čímž je zaručena rovnoměrnost a homogenita náplně kolony^{1,3}.

3.1.3. Mobilní fáze

Mobilní fáze používané pro HPLC musí být velmi čisté. Pro odstranění částic větších než 0,45 μm se jednotlivé složky mobilní fáze před užitím filtrují. Při chromatografii s normálními fázemi se používá nepolární mobilní fáze a polární stacionární fáze. Čím více je vzorek nepolární, tím méně je zadržován na koloně. Aby bylo dosaženo reprodukovatelných

výsledků, je třeba přísně kontrolovat přítomnost vody v mobilní fázi. V chromatografii s obrácenými fázemi se používají vodné mobilní fáze, které mohou být jak s organickým rozpouštědlem, tak i bez něj. Je-li třeba nastavit pH, změna se provádí pouze s vodnou částí^{3,4}.

Pokud je HPLC analýza uskutečňována za konstantního složení mobilní fáze, jedná se o tzv. izokratickou eluci. Tento typ eluce se pro analytické účely používá nejčastěji. Při gradientové eluci se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává druhá, čímž se vytváří plynulý koncentrační gradient mobilní fáze^{1,3}.

3.1.4. Detektory

V kapalinové chromatografii rozlišujeme různé způsoby detekce. Výsledek chromatografické analýzy ve velké míře závisí na citlivosti a spolehlivosti zvoleného detektoru. Nejčastěji používaným detektorem při HPLC analýze je pro svoji univerzálnost a poměrně vysokou citlivost UV-VIS detektor. V poslední době je také stále více využíváno hmotnostně spektrometrického detektoru, který patří mezi nejcitlivější a nejselektivnější detektory.

Typy užívaných detektorů:

- **Spektrofotometrické detektory:** Jsou založeny na principu interakce látek s elektromagnetickým zářením. Detektor proměřuje absorpenci záření určité vlnové délky složkami eluátu, který protéká celou detektorem. Především se využívá UV oblast spektra, protože většina organických látek v této oblasti absorbuje. Nejpopulárnější jsou UV-VIS detektory s proměnnou vlnovou délkou, kterou lze nastavit podle potřeb analýzy.
- **Fluorimetrické detektory:** Tyto detektory jsou použitelné pouze u fluoreskujících látek nebo u substancí, které jsou po derivatizaci s vhodným činidlem převedeny na fluoreskující deriváty. Oproti UV-VIS detektorům jsou méně univerzální. Jejich hlavní předností je ovšem vysoká citlivost a selektivita.
- **Elektrochemické detektory:** Používají se k detekci látek schopných elektrochemické reakce, která probíhá na rozhraní elektroda – eluent. Detektory měří hodnotu určité elektrochemické veličiny, která je závislá na koncentraci analyzované látky.

- **Refraktometrické detektory:** Patří mezi univerzální detektory, které vyhodnotí všechny typy látek. Detekce je založena na měření rozdílného indexu lomu mezi mobilní fází a eluátem, který obsahuje analyzovanou látku. Refraktometrické detektory nejsou příliš citlivé a při užívání je nutné je termostatovat, protože index lomu je značně závislý na teplotě. Pro tyto nevýhody jsou používány pouze ojediněle.
- **Hmotnostně spektrometrické detektory:** Pro detekci látek hmotnostním spektrometrem je nutné nejprve z eluentu odstranit mobilní fázi. Následně jsou neutrální molekuly vzorku ionizovány v iontovém zdroji. Nabité částice jsou poté rozděleny podle poměru hmotnost/náboj v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli a je získáno hmotnostní spektrum^{1,3}.

3.2. Validace analytických metod

Validace analytické metody je proces, při kterém se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Potvrzuje a dokumentuje kvalitu zvolené analytické metody. Cílem validace je určit podmínky, při kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit stejné a spolehlivé výsledky při opakovaném použití.

Během validace se vytváří protokol, ve kterém jsou zpracovány zjištěné hodnoty jednotlivých validačních parametrů. Součástí validace analytické metody je test způsobilosti systému. Při každém novém použití metody se nemusí opakovat celá validace, ale musí být zjištěny parametry testu způsobilosti (např. rozlišení, faktor symetrie). Splněním požadavků testu způsobilosti je zaručeno, že metoda bude poskytovat spolehlivé výsledky. V případě, že některý parametr neodpovídá, je možné upravit chromatografické podmínky v rozsahu povolených změn tak, aby byla kritéria splněna^{1,5}.

3.2.1. Validační parametry

Správnost vystihuje shodu mezi správnou hodnotou a získaným výsledkem. Správnou hodnotu je možné zjistit jinou nezávislou metodou, jejíž správnost je ověřena, nebo analýzou modelového vzorku připraveného ze všech složek přípravku s přidavkem standardu. Pokud

nejsou k dispozici všechny složky přípravku, připraví se vzorek přípravku se známým přídavkem standardu. Správnost se vyjadřuje jako rozdíl získaných hodnot nebo jako výtěžnost.

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 * \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

Selektivita metody je schopnost změřit správně stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek, které lze očekávat. Jedná se především o pomocné látky, další účinné látky u složených přípravků, rozkladné produkty či nečistoty.

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Vyjádří se jako relativní směrodatná odchylka těchto stanovení. Podle podmínek opakování rozlišujeme opakovatelnost a reprodukovatelnost. Pokud se metoda provádí stejným způsobem na jednom přístroji se stejnými činidly a jedním pracovníkem, jedná se o opakovatelnost. Při stanovení reprodukovatelnosti se metoda provádí v různých laboratořích s různými činidly, pracovníky i přístroji. Vše je ale prováděno se stejným zhomogenizovaným vzorkem.

Detekční a kvantitativní limit vyjadřují citlivost metody. Detekční limit odpovídá nejnižší ještě detekovatelné koncentraci látky. Kvantitativní limit je pak nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností.

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150 % požadované hodnoty. Je-li metoda lineární, je možné určit směrnici z jednoho kalibračního bodu.

Robustnost vystihuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Cílem je upozornit na podmínky, které by mohly ovlivnit výsledky. U metod využívajících HPLC se sledují například vlivy na složení mobilní fáze, pH vodné složky, rychlost průtoku či rozdíl mezi kolonami různých výrobců¹.

3.3. Nikotin

CAS: 54-11-5

Definice: 3-[(2*S*)-1-methylpyrrolidin-2-yl]pyridin

Obsah: Obsahuje 99,0 % až 101,0 % sloučeniny C₁₀H₁₄N₂, počítáno na bezvodou látku.

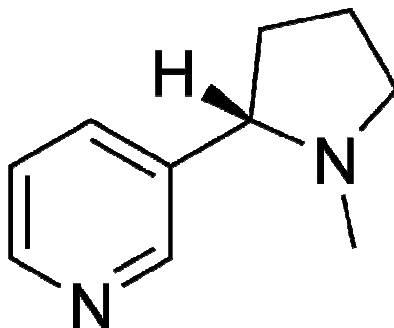
Vzhled: Bezbarvá nebo nahnědlá viskózní těkavá hygroskopická kapalina.

Rozpustnost: Dobře rozpustný ve vodě, mísitelný s ethanolem bezvodým.

M_r: 162,23

Vzorec: viz. obrázek 2

Nikotin má v Českém lékopise 2009 svoji monografii s názvem Nicotinum (evropská část, 2. díl, str. 2752-2753)⁵.



Obrázek 2: Chemická struktura nikotinu⁶

3.3.1. Farmakologické vlastnosti nikotinu

Nikotin je agonista nikotinových receptorů v CNS, v gangliích a v neuromuskulární ploténce a má výrazné účinky na CNS, GIT a kardiovaskulární systém. Pravidelný přívod nikotinu způsobí pro jeho stimulující centrální účinky návyk. Náhlé ukončení pravidelného užívání tabákových výrobků způsobuje abstinenční příznaky. Přívod nikotinu nikotinovými

náplastmi, nikotinovou žvýkačkou či jinou lékovou formou má kuřákovi usnadnit odřeknutí si kouření cigaret⁷.

3.4. Kotinin

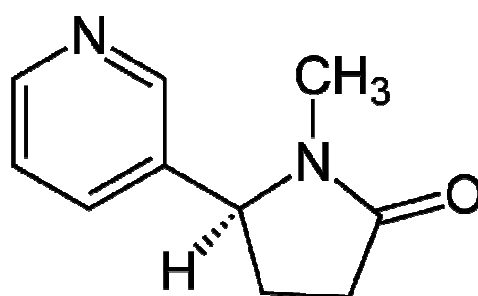
CAS: 486-56-6

Definice: (5*S*)-1-methyl-5-(3-pyridyl)pyrrolidin-2-on

Vzhled: Bezbarvá až světle hnědá pevná látka.

M_r: 176,22

Vzorec: viz. obrázek 3



Obrázek 3: Chemická struktura kotininu⁸

Kotinin (jde o anagram slova nikotin) je hlavním metabolitem a příbuznou látkou nikotinu. Jeho stanovení se využívá při hodnocení expozice organismu tabáku. Kotinin lze prokázat i u pasivních kuřáků. Vyšetření je možné z moči, slin a krve. Kotinin má biologický poločas přibližně 20 hodin a na rozdíl od nikotinu, který má poločas 2 hodiny, je prokazatelný v organismu po několik dní od užití poslední cigarety. Někdy je ovšem možné získat falešně pozitivní výsledek a to u pacientů, kteří užívají náhradní nikotinovou terapii^{8,9}.

3.5. Následky kouření tabáku

Přestože je dnes všeobecně známo, že kouření cigaret je zdraví škodlivé, nedochází ke snižování jejich spotřeby. Kouření tabáku je přitom příčinou téměř pětiny úmrtí. Za účinky kouření tabáku není odpovědný pouze nikotin, ale i všechny ostatní látky obsažené v tabákovém kouři, z nichž některé jsou průkazně kancerogenní^{7,9}. Z toxikologického hlediska je třeba rozlišovat následky kouření způsobené účinkem nikotinu od působení tabákového kouře.

3.5.1. Poškození nikotinem

Nikotin je silný jed s letálními dávkami přibližně od 50 mg. Tyto dávky způsobují tonicko-klonické křeče a depresí dechu vedou ke smrti. Samotným kouřením se akutní letální dávky dosáhnout nedá. Dlouhodobý přívod menších dávek nikotinu ovšem vede ke zvýšení rizika chorob srdce, cév či gastroduodenálních vředů.

Poškození mohou být způsobená i tzv. pasivním kouřením. Hlavní podíl nikotinu z cigaret (asi 70 %) se nedostává do kuřákových úst, ale jde přímo do vzduchu spolu s ostatními prchavými látkami. Lidé v okolí kuřáka, především v malých prostorech, tedy pasivně kouří. Nekuřák, který se zdržuje v zakouřených prostorech, přijme přibližně takové množství nikotinu, které odpovídá vykouření jedné třetiny cigarety.

3.5.2. Poškození tabákovým kouřem

V tabákovém kouři se kromě nikotinu vyskytuje mnoho dalších látek, které mají toxikologický význam. Jednou z nich je oxid uhelnatý. Z cigaretového kouře se ho resorbuje pouze malé množství, takže k otravám nedochází. V krvi kuřáka se však část hemoglobinu vyskytuje ve formě karboxyhemoglobinu, což může mít u silných kuřáků při velké zátěži vážné následky.

Součástí tabákového kouře jsou také dráždivé plyny (aldehydy, amoniak), které tlumí pohyb řasinkového epitelu. To usnadňuje vznik bakteriální infekce a způsobuje rozvoj chronické bronchitidy, která se vyskytuje při pravidelném kouření tabáku. Trvalý zánět sliznic respiračního traktu představuje také zvýšené riziko karcinomu.

Mezi přímé karcinogeny nacházející se v cigaretovém kouři patří především dehet. Po desetileté expozici tabákovým kouřem dochází u kuřáků k rozvoji rakoviny plic přibližně patnáctkrát častěji než u nekuřáků. Mimo jiné existuje také významná souvislost mezi kouřením a rakovinou dutiny ústní, hrtanu, pankreatu a močového měchýře¹⁰.

3.6. Náhradní nikotinová terapie

Po ukončení kouření klesá v průběhu pěti až deseti let riziko smrti na kardiovaskulární příhody téměř až k hodnotám rizika u nekuřáků. Podobně se snižuje i riziko vzniku bronchiálního karcinomu⁷. Přestat s kouřením tabáku má tedy smysl vždy a to i u osob kouřících mnoho let.

Ukončit kouření si přeje kolem 70 % kuřáku v ČR. Mnoho z nich zkusí přestat bez cizí pomoci. Úspěšnost těchto pokusů je ovšem minimální. Pro většinu je obtížné ukončit kouření, protože užívání tabáku způsobuje silnou závislost¹¹. Abstinenční příznaky nikotinové závislosti lze zmírnit použitím vhodné formy náhradní nikotinové léčby. Náhradní nikotinová terapie (NRT - Nicotine Replacement Therapy) je volně prodejná v lékárně a oproti placebo zdvojnásobuje úspěšnost abstinence. Malé množství nikotinu dodané tělu pomáhá jedinci v momentě neodolatelné chuti na cigaretu⁹.

Nikotin užívaný k odvykání kouření se může aplikovat v různých lékových formách. Jako terciární amin je dostatečně lipofilní, takže dobře proniká biologickými bariérami, včetně kůže¹². U jedinců, kteří se přes den nechtějí zabývat svoji léčbou, je vhodné využít jako NRT nikotinové náplasti. U náplastí je zajištěno kontinuální uvolňování, které je ovšem pomalejší oproti ostatním formám, které umožní pružněji reagovat na touhu po cigaretách. Proto je u silných kuřáků možná kombinace náplastí s některou další lékovou formou (žvýkačky, sublinguální tablety, inhalátor, ústní sprej)⁹.

Délka léčby náhradní nikotinovou terapií by obvykle měla trvat minimálně 8 až 12 týdnů. Léčba kratší než osm týdnů ztrácí účinnost, takže není zaručeno zdvojnásobení úspěšnosti ukončení kouření. Na počátku léčby je důležité zvolit vhodné dávkování v závislosti na průměrném počtu vykouřených cigaret za den. NRT je třeba vysazovat postupným snižováním počtu dávek za den či snížením koncentrace nikotinu v léčivém přípravku. Při stanovování dávky je třeba počítat s tím, že celé množství nikotinu uvedené na

obalu se vstřebává pouze z náplastí. U orálních lékových forem NRT je většinou vstřebatelná pouze polovina uvedeného množství. Absorpce nikotinu je navíc závislá na hodnotě pH^{9,11}. Nikotin je slabá base ($pK_A = 8,02$)¹³ a vstřebává se při lehce zásaditém pH. Proto není vhodné současně při užívání orálních forem NRT pít nebo jíst kyselé.

Náhradní nikotinová terapie je doporučována všem kuřákům závislých na nikotinu, kteří nemohou přestat s kouřením bez léčby. Čistý nikotin ve formě NRT je vždy méně nebezpečný než samotné kouření, kdy jedinec spolu s nikotinem vdechuje několik tisíc dalších chemikálií. NRT je proto indikována i u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním, v dětském věku a i těhotným a kojícím ženám. U pacientů se zvýšeným rizikem je vždy doporučen lékařský dohled¹¹.

Ačkoli kuřák kouří především kvůli nikotinu, nemalou roli v závislosti na tabáku hraje i psychická složka. Kouření začíná psychosociální závislostí. Během let kouření si jedinec naučené chování a kuřácké stereotypy fixuje. Proto k úspěšné abstinenci samotný přívod nikotinu mnohdy nestačí. Nejčastější doba relapsů při odvykání kouření bývá během prvních třech měsíců. V této době by se měl pacient vyhýbat situacím, které má spojené s kouřením (např. pití kávy, posezení s přáteli). K úspěchu je tedy nutné hlavně pevné rozhodnutí pacienta. Náhradní nikotinová terapie pak slouží především k zabránění abstinčních příznaků^{9,10,14}.

3.7. Nikotinový ústní sprej

Hlavním důvodem, proč lidé pokračují v kouření, je závislost na nikotinu v tabáku. Vstříknutím ústního spreje dochází k okamžité aplikaci nikotinu, což může vyřešit kuřákovu chuť na cigaretu v místech, kde se kouřit nesmí. Roztok přípravku se přes bukalní sliznici dostává do krevního oběhu, což zajistí velmi rychlý nástup účinku nikotinu¹⁵.

Nikotinový ústní sprej může také pomoci v odvykání kouření. Pravidelné užívání cigaret způsobuje abstinční příznaky, kdy má pacient velkou chuť zapálit si cigaretu. V randomizované kontrolované studii byla prokázána zvýšená šance na ukončení kouření při užívání nikotinového ústního spreje oproti placebo¹⁶. Výhodou orálního spreje je velmi rychlé vstřebání nikotinu, který při substituční léčbě zmírňuje abstinční příznaky. Nikotinový ústní

sprej proto poskytuje rychlejší úlevu od chutě na cigaretu v porovnání s nikotinovými pastilkami¹⁷.

3.7.1. Přípravek Nicostar

Přípravek Nicostar je nikotinový sprej, který se užívá vstříknutím do dutiny ústní. Zajišťuje okamžitou aplikaci nikotinu, která je na rozdíl od kouření cigaret ohleduplná k okolí.

3.7.1.1. Složení přípravku

Hlavní aktivní látka: Nikotin (15 ml roztoku obsahuje 11-13,5 mg nikotinu)

Pomocné látky: Voda, glycerin, extrakt z plodů rostliny *Malpighia glabra*, extrakt z lékořice, extrakt zázvorníku lékařského, epigalokatechin galát, kávové/mátové/jahodové aroma, kyselina citronová, sorban draselný, benzoan sodný, sukralosa, pegylovaný hydrogenovaný ricinový olej

3.7.1.2. Použití

Přípravek se užívá zejména v místech, kde se nesmí kouřit. To je například v kanceláři, divadle, letadle či dalších dopravních prostředcích. Kuřákovi poskytne diskrétní aplikaci nikotinu v případě neodolatelné touhy zapálit si cigaretu. Maximální jednorázová dávka zahrnuje 3 stříknutí, což odpovídá běžné cigaretě (Jedno stříknutí obsahuje 0,110 až 0,135 mg nikotinu)¹⁵.

3.8. Elektronická cigareta

Elektronická cigareta je zařízení, které vytváří páru podobnou kouři zahřátím kapalné náplně. Je složena z baterie, z patrony (cartridge) s náplní a z atomizéru, který je zodpovědný za odpaření náplně. Základní složkou náplně do elektronické cigarety (e-liquid) je nejčastěji propylenglykol a/nebo glycerol. Dalšími složkami mohou být různé aromatické látky, alkoholy a v neposlední řadě volitelná koncentrace nikotinu^{18,19}.

Většina elektronických cigaret je navržena tak, aby vzhledem a užitím napodobovaly kouření cigaret či doutníků. Existují ale také e-cigarety, které vypadají jako předměty každodenní potřeby (pera, USB zařízení). Tento vzhled e-cigaret využívají především lidé, kteří je chtějí používat bez povšimnutí okolí^{19,20}.

Elektronické cigarety poskytují bezpečnější alternativu kouření, protože eliminují dehty a oxid uhelnatý, které vznikají spalováním tabáku. Mohou také pomoci při odvykání kouření. Zmírňují touhu kouřit a abstinenční příznaky²¹. V průběhu randomizované kontrolované studie bylo zjištěno, že elektronické cigarety jsou v odvykání kouření přinejmenším stejně účinné jako nikotinové náplasti²².

Světová zdravotnická organizace nedoporučuje spotřebitelům užívat elektronické cigarety, protože nebyla dostatečně prokázána jejich bezpečnost. Jednotlivé výrobky se značně liší v množství nikotinu a jiných chemických látek a spotřebitel nemůže zjistit, co vše je do výrobku vlastně dodáváno. Většina náplní obsahuje vysoké koncentrace propylenglykolu, který je známý svou dráždivostí při vdechování. Užívání těchto výrobků může také způsobit otravu nikotinem. Největší riziko hrozí především dětem, které by spolky obsah nikotinové cartridge. Elektronické cigarety a jejich náplně proto musí být vždy uchovávány mimo dosah malých dětí²⁰.

3.8.1. Kategorizace elektronických cigaret

Pokud výrobce označí účel použití e-cigarety jako pomůcku při odvykání kouření, lze elektronickou cigaretu řadit mezi léčivé přípravky v kombinaci se zdravotnickým prostředkem. Nikotinová náplň, která léčbě napomáhá, je léčivý přípravek a vlastní elektronická cigareta je zdravotnický prostředek, neboť slouží k aplikaci léčiva. V České republice momentálně není žádná náplň registrována jako léčivý přípravek. Na SÚKL jsou

registrovány léčivé přípravky k náhradní nikotinové terapii například ve formě žvýkaček, náplastí, pastilek, spreje.

Elektronická cigareta, která je užívána za účelem prosté alternativy klasické cigarety, je brána jako obecný výrobek. Náplně obsahující nikotin jsou nebezpečné chemické směsi, protože nikotin je nebezpečnou látkou. Podle obsahu nikotinu můžeme směsi klasifikovat jako zdraví škodlivé (obsah nikotinu je 0,1-1 %) a toxické (obsah nikotinu je 1-7 %). Dle chemického zákona je osoba odpovědná za uvádění náplní do elektronických cigaret na trh povinna je náležitě klasifikovat a označit. Na obalu musí být uvedeny symboly nebezpečnosti, věty označující specifickou rizikovost a pokyny pro bezpečné nakládání s látkou¹⁸.

3.9. HPLC metody zabývající se stanovením nikotinu a kotininu

Byla vypracována rešerše z portálu ScienceDirect, který poskytuje přístup k vědeckým časopisům z nakladatelství Elsevier. V následující tabulce jsou uvedeny výsledky několika článků zaměřených na stanovení nikotinu a kotininu s využitím HPLC.

Tabulka 1: Metody zabývající se HPLC analýzou nikotinu a kotininu.

Hodnocené látky	Materiál	Způsob detekce	Mobilní fáze	Kolona	Průtok (ml/min)	Vnitřní standard	Zdroj
nikotin, kotinin	krev, mozková tkáň	UV 260 nm	acetonitril-methanol-20mM fosfátový pufr (55:45:900, v/v/v, pH 5,1)	fenylhexylová (150 x 4,6 mm)	1	není použit	[23]
nikotin, kotinin	moč	UV 259 nm	acetátový pufr-acetonitril (78:22, v/v, pH 3,6)	C18 (250 x 4,6 mm)	1	2-fenylimidazol	[24]
nikotin	čistá forma a různé lékové formy (tablety, nikotinové žvýkačky)	UV 259 nm	fosfátový pufr-methanol (35:65, v/v, pH 6,8)	C18 (250 x 4,6 mm)	1	není použit	[25]

nikotin, kotinin	plazma	UV 260 nm	methanol-fosfátový pufr	C18 (150 x 4,6 mm)	1	acetanilid	[26]
nikotin, kotinin	moč	UV 260 nm	acetonitril-methanol- acetátový pufr (90:30:880, v/v, pH 4,8)	C18 (250 x 4,6 mm)	1 a 0,6	2-fenylimidazol	[27]
nikotin, kotinin	mateřské mléko	UV 260 nm	acetonitril : fosfáto- citrátový pufr	C8 (100 x 2,1 mm)	0,25	<i>N</i> -acetylprokainamid	[28]
nikotin, kotinin	sérum	UV 333 – 424 nm	acetátový pufr : acetonitril (80:20, v/v, pH 4)	C18 (150 x 4,6 mm)	1	6-aminochinolin	[13]

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Vzorky

Nicostar 15 ml nicotine spray, šarže 2331, Heglund a.s., Revoluční 655/1, 110 00 Praha

E-liquid 10 ml ALIEN, Tobacco Blue 11 mg, Traffic a.s., Fáblovka 568, 533 52 Pardubice

E-liquid 10 ml Dekang, Desert Ship 6 mg, ELKO TRADING spol. s r.o., K Terminálu 7, 619 00 Brno

4.1.2. Chemikálie

Kotinin, šarže: 121M4084V, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Nikotin, šarže: 1449194V, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Octan amonný, šarže: SZBA3350V, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Triethylamin, šarže: BCBJ1639V, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Trimethoprim, šarže: 200102061, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

4.1.3. Pomůcky a přístroje

Analytické váhy, Sartorius, Německo

Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze Millipore, USA

HPLC kolona Discovery[®] HS C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m, Sigma-Aldrich

HPLC kolona ZORBAX Rapid Resolution[®] Extend-C18, 75 x 4,6 mm, 3,5 μ m, Agilent Technologies

HPLC kolona Phenomenex[®] Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm, Phenomenex

HPLC kolona Supelco Discovery[®] HS F5, 100 x 4 mm, 3 μ m, Sigma-Aldrich

HPLC kolona XTerra[®]MS C18, 100 x 4,6 mm, 3,5 μm, Waters

HPLC sestava: Shimadzu LC-2010C, Shimadzu corp., Japonsko

Laboratorní pH metr Hanna instruments, pH 212, Německo

Běžné laboratorní vybavení a sklo

4.2. Vývoj metody

Cílem bylo nalézt optimální podmínky pro stanovení nikotinu a kotininu, při kterých bude možné metodu validovat. Nejprve byly testovány různé kolony, mobilní fáze a jejich složení. Následně byl hledán vhodný vnitřní standard. (Viz. výsledky a diskuze - kapitola 5.1.)

4.3. Pracovní postup

4.3.1. HPLC sestava a podmínky separace

Kolona: XTerra[®]MS C18, délka 100 mm, průměr 4,6 mm, velikost částic 3,5 μm

Mobilní fáze: acetonitril : 10mM octan amonný pH 9 = 20 : 80 (v/v)

Průtok mobilní fáze: $F_m = 1,0$ ml/min

Typ eluce: izokratická eluce

Vlnová délka detekce: $\lambda = 260$ nm

Objem nástřiku: $V = 5$ μl

Teplota: 25°C

4.3.2. Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smísením acetonitrilu a acetátového pufru o pH 9 v poměru 20 : 80 (v/v). Acetátový pufr byl připraven rozpuštěním 0,1925 g octanu amonného ve vodě a následným doplněním vodou na 250 ml. Na pH metru bylo pH upraveno přidáním několika kapek triethylaminu na hodnotu 9,0. Po smísení byla provedena filtrace na filtračním zařízení na mobilní fáze.

4.3.3. Příprava zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml)

Přibližně přesně 17,5 mg nikotinu bylo rozpuštěno v 50 ml acetonitrilu ve 100ml odměrné baňce a doplněno vodou na 100 ml.

4.3.4. Příprava zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml)

Přibližně přesně 12,5 mg trimetoprimu bylo rozpuštěno v 12,5 ml acetonitrilu v 25ml odměrné baňce a doplněno vodou na 25 ml.

4.3.5. Příprava standardního roztoku (nikotin 7 mg/100 ml, kotinin 3,2 mg/100 ml, trimetoprim 4 mg/100 ml)

Standardní roztok byl připraven navážením přibližně přesně 0,8 mg kotininu do 25ml odměrné baňky. Následně byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml), 10 ml zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.6. Příprava pracovního roztoku trimetoprimu (25 mg/100 ml) pro stanovení linearity

Přibližně přesně 12,5 mg trimetoprimu bylo rozpuštěno v 25 ml acetonitrilu v 50ml odměrné baňce a doplněno vodou na 50,00 ml.

4.3.7. Příprava pracovního roztoku nikotinu (35 mg/100 ml) pro stanovení linearity

Přibližně přesně 17,5 mg nikotinu bylo rozpuštěno v 25 ml acetonitrilu v 50ml odměrné baňce a doplněno vodou na 50 ml.

4.3.8. Příprava pracovního roztoku kotininu (15 mg/100 ml) pro stanovení linearity

Přibližně přesně 7,5 mg kotininu bylo rozpuštěno v 25 ml acetonitrilu v 50ml odměrné baňce a doplněno vodou na 50 ml.

4.3.9. Příprava vzorku Nicostar

Přibližně přesně 1,0000 g vzorku byl navážen do 25ml odměrné baňky. Dále byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.10. Příprava vzorku Tobacco Blue

Přibližně přesně 0,1000 g vzorku bylo naváženo do 25ml odměrné baňky, byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.11. Příprava vzorku Desert Ship

Přibližně přesně 0,2500 g vzorku bylo naváženo do 25ml odměrné baňky, byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.12. Příprava vzorku Nicostar pro stanovení parametru správnosti

Přibližně 1,0000 g vzorku byl přesně navážen do 25ml odměrné baňky. Dále byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml) a 5 ml zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml). Roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.13. Příprava vzorku Tobacco Blue pro stanovení parametru správnosti

Přibližně 0,1000 g vzorku byl přesně navážen do 25ml odměrné baňky, byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml), 5 ml zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.14. Příprava vzorku Desert Ship pro stanovení parametru správnosti

Přibližně 0,2500 g vzorku bylo přesně naváženo do 25ml odměrné baňky, byly přidány 2 ml zásobního roztoku trimetoprimu (50 mg/100 ml), 5 ml zásobního roztoku nikotinu (17,5 mg/100 ml) a roztok byl doplněn po rysku směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.15. Příprava roztoků pro stanovení parametru linearity

Bylo připraveno 6 roztoků s různou koncentrací kotininu a nikotinu a s koncentrací vnitřního standardu 2 mg/100 ml. K přípravě těchto roztoků byly použity pracovní roztoky trimetoprimu, nikotinu a kotininu připravené dle kap. 4.3.6., 4.3.7. a 4.3.8.

Roztok č. 1 o koncentraci nikotinu 0,7 mg/100 ml a kotininu 0,3 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 0,5 ml pracovního roztoku nikotinu a 0,5 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

Roztok č. 2 o koncentraci nikotinu 1,4 mg/100 ml a kotininu 0,6 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále byl přidán 1 ml pracovního roztoku nikotinu a 1 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

Roztok č. 3 o koncentraci nikotinu 3,5 mg/100 ml a kotininu 1,5 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 2,5 ml pracovního roztoku nikotinu a 2,5 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

Roztok č. 4 o koncentraci nikotinu 5,6 mg/100 ml a kotininu 2,4 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále byly přidány 4 ml pracovního roztoku nikotinu a 4 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

Roztok č. 5 o koncentraci nikotinu 7 mg/100 ml a kotininu 3 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 5 ml pracovního roztoku nikotinu a 5 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

Roztok č. 6 o koncentraci nikotinu 8,4 mg/100 ml a kotininu 3,6 mg/100 ml byl připraven přidáním 2 ml pracovního roztoku trimetoprimu do 25ml odměrné baňky. Dále bylo přidáno 6 ml pracovního roztoku nikotinu a 6 ml pracovního roztoku kotininu. Roztok byl doplněn na 25 ml směsí acetonitril-voda v poměru 1:1.

4.3.16. Stanovení obsahu nikotinu ve vzorcích

Byl připraven standardní roztok dle kap. 4.3.5. Roztok byl změřen třikrát a pro následný výpočet byly využity aritmetické průměry ploch píků. Roztoky vzorků byly připraveny dle postupu v kap. 4.3.9., 4.3.10., 4.3.11. a následně byly třikrát změřeny a pro výpočet byly použity aritmetické průměry.

Výpočet obsahu nikotinu ve vzorku Nicostar, Tobacco blue a Desert Ship byl proveden podle vzorce:

$$c = \frac{N_{vz} * T_{st} * m_{st}}{N_{st} * T_{vz} * m_{vz}}$$

c = obsah nikotinu v 1 gramu vzorku v gramech

N_{vz} = plocha píku nikotinu v roztoku vzorku

N_{st} = plocha píku nikotinu v roztoku standardu

T_{vz} = plocha píku trimetoprimu v roztoku vzorku

T_{st} = plocha píku trimetoprimu v roztoku standardu

m_{st} = navážka nikotinu v g (ve 100 ml standardu)

m_{vz} = navážka vzorku

5. Výsledky a diskuze

5.1. Optimalizace metody

V rámci diplomové práce bylo testováno 5 chromatografických kolon, jejichž výběr vycházel z informací z dostupné odborné literatury. Organickou částí mobilní fáze byl methanol nebo acetonitril. Jako vodná složka mobilní fáze byl zkoušen 10 a 20 mM fosfátový a acetátový pufr, jejichž pH bylo různě měněno, protože nikotin je slabá zásada ($pK_A = 8,02$).

Při jednotlivých analýzách byl sledován retenční čas, rozlišení mezi stanovovanými látkami a faktor symetrie píků. Píky, jejichž faktor symetrie je menší než 0,8 nebo vyšší než 1,5, jsou v rámci diplomové práce označovány jako píky, jejichž tvar je nevyhovující.

5.1.1. Výběr stacionární a mobilní fáze

Byly testovány následující kolony:

- HPLC kolona Discovery[®] HS C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m

Jako vodná složka mobilní fáze byl zkoušen 10mM fosfátový a 10mM acetátový pufr. U mobilní fáze methanol:fosfátový pufr pH 6,8 = 35 : 65 (v/v) nedošlo k rozdělení jednotlivých složek. Při změně poměru látek mobilní fáze na 45 : 55 (v/v) došlo sice k rozdělení kotininu a nikotinu, tvar píku nikotinu byl ovšem nevyhovující.

Při mobilní fázi acetonitril:fosfátový pufr pH 6,8 = 55 : 45 (v/v) bylo nedostatečné rozlišení složek a tvar píku nikotinu byl také nevyhovující. Dále byl změněn fosfátový pufr za acetátový o pH 7. Ani u této mobilní fáze neměl pík nikotinu faktor symetrie do 1,5.

Tabulka 2: HPLC kolona Discovery[®] HS C18, 100 x 4,6 mm, 5 μ m

Složení mobilní fáze	Retenční čas t_R (min)		Faktor symetrie		Rozlišení
	kotinin	nikotin	kotinin	nikotin	
methanol:fosfátový pufr pH 6,8 = 35 :65	1,23	1,98	0,92	2,56	-
methanol:fosfátový pufr pH 6,8 = 45 :55	1,33	2,63	0,96	3,12	3,5
acetonitril:fosfátový pufr pH 6,8 = 55 :45	1,07	1,69	1,29	3,81	0,57
acetonitril:acetátový pufr pH 7 = 55 : 45	1,07	1,68	1,23	3,97	1,45

- HPLC kolona ZORBAX Rapid Resolution[®] Extend-C18, 4,6 x 75mm, 3,5 μ m

Na této koloně byla testována mobilní fáze acetátový pufr (pH 9; 10 mM):acetonitril (45:55 v/v). Pík kotininu nebyl dostatečně oddělen od mrtvého času kolony, proto tato mobilní fáze nebyla využita k další analýze. Mrtvý čas kolony byl stanoven pomocí jodidu draselného, který není na koloně zadržován.

Následně byla zkoušena mobilní fáze acetátový pufr (pH 9; 10 mM):methanol (45:55 v/v). Výsledkem byl chvostující pík nikotinu nevhodný pro další analýzu.

Tabulka 3: HPLC kolona ZORBAX Rapid Resolution[®] Extend-C18, 4,6 x 75mm, 3,5 μ m

Složení mobilní fáze	Retenční čas t_R (min)		Faktor symetrie		Rozlišení
	kotinin	nikotin	kotinin	nikotin	
acetonitril:acetátový pufr pH 9 = 55 : 45	0,89	1,45	1,56	2,15	6,16
methanol:acetátový pufr pH 9 = 55 : 45	1,02	2,02	1,14	2,41	2,27

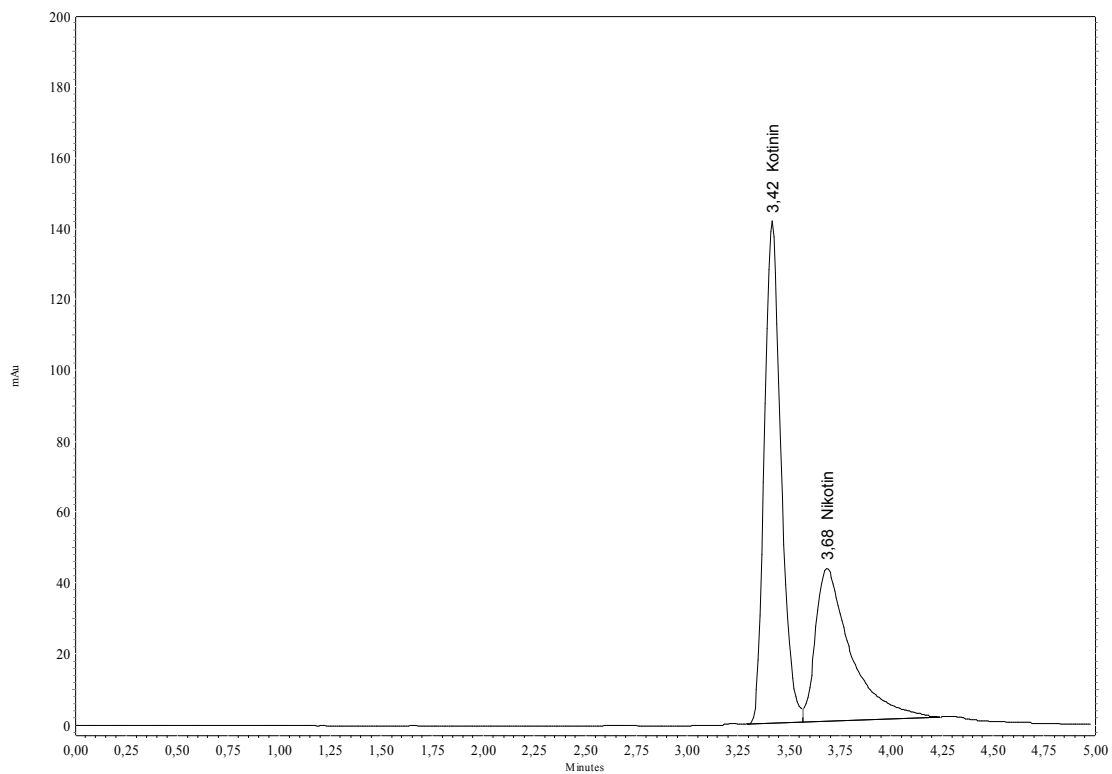
- HPLC kolona Phenomenex[®] Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm

Při mobilní fázi acetonitril:fosfátový pufr (20 mM) = 50:50 (v/v) bylo postupně měněno pH pufru. Vyšší pH nebylo optimální, protože tvar píku nikotinu byl nevyhovující. Snižováním hodnoty pH došlo ke snížení retenčního času nikotinu, takže nedošlo k úplnému rozdělení analyzovaných složek.

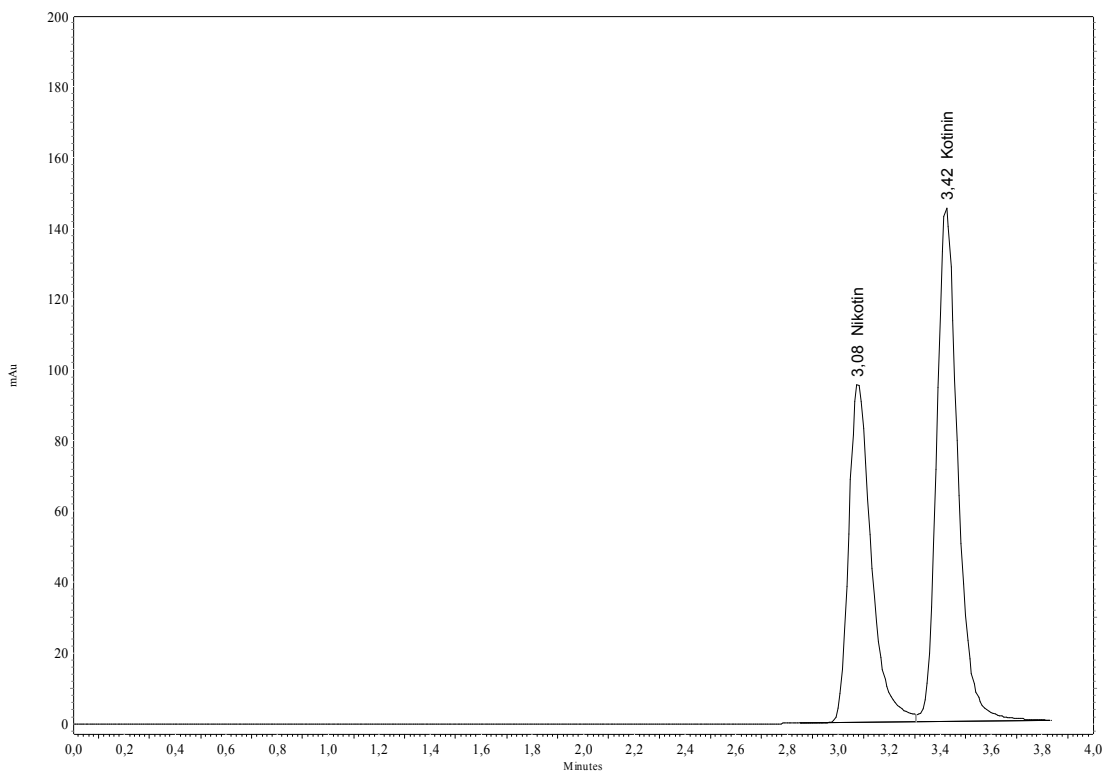
Změnou acetonitrilu za methanol v mobilní fázi došlo ke značnému prodloužení analýzy a tvary píků kotininu a nikotinu byly nevyhovující. Dále byly měněny poměry acetonitrilu a fosfátového pufru v mobilní fázi, což také nevedlo k získání optimálních výsledků, protože nebylo dostatečné rozlišení mezi píky. Nakonec byla na této koloně testována mobilní fáze acetonitril:20mM octan amonný pH 4 (50:50 v/v), která také nevyhovovala, protože píky nikotinu a kotininu se částečně překrývaly.

Tabulka 4: HPLC kolona Phenomenex® Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm

Složení mobilní fáze	pH pufru	Retenční čas (min)		Faktor symetrie		Rozlišení
		Kotinin	nikotin	kotinin	nikotin	
acetonitril:fosfátový pufr = 50 : 50	7	3,42	4,74	1,23	3,25	1,52
acetonitril:fosfátový pufr = 50 : 50	6	3,42	3,68	1,20	2,77	1,63
acetonitril:fosfátový pufr = 50 : 50	5	3,5	3,15	1,27	1,62	-
acetonitril:fosfátový pufr = 50 : 50	4	3,34	2,95	1,33	1,43	1,48
acetonitril:fosfátový pufr = 50 : 50	3	3,21	2,87	1,28	1,29	1,55
methanol:fosfátový pufr = 50 : 50	3	12,54	8,3	-	1,6	5,79
acetonitril:fosfátový pufr = 40 : 60	4	3,57	2,92	1,1	1,42	1,5
acetonitril:fosfátový pufr = 45 : 55	4	3,44	2,85	1,29	1,37	1,08
acetonitril:acetátový pufr = 50 : 50	4	3,42	3,08	1,24	1,37	1,0



Obrázek 4: Chromatogram roztoku nikotinu a kotininu při použití mobilní fáze acetonitril:fosfátový pufr 50 : 50 v/v (pH vodné složky upraveno na 6 kyselinou fosforečnou). Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Phenomenex[®] Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm.



Obrázek 5: Chromatogram roztoku nikotinu a kotininu při použití mobilní fáze acetonitril:acetátový pufr = 50 : 50 v/v (pH vodné složky upraveno na 4 kyselinou octovou). Průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, kolona Phenomenex[®] Luna 3u Phenyl-Hexyl, 150 x 4,6 mm.

- HPLC kolona Supelco Discovery[®] HS F5, 100 x 4 mm, 3 μm

U mobilní fáze acetonitril:acetátový pufr (10 mM) = 50:50 (v/v) bylo postupně měněno pH vodné složky. Vyšší pH nevyhovovalo, protože faktor symetrie u nikotinu byl nad 1,5. Při nižším pH byly získány hezké píky, které byly od sebe dostatečně odděleny. Tato kolona nebyla nakonec využita k další analýze, protože pík kotininu byl blízko mrtvému retenčnímu času.

Tabulka 5: HPLC kolona Supelco Discovery® HS F5, 100 x 4 mm, 3 µm

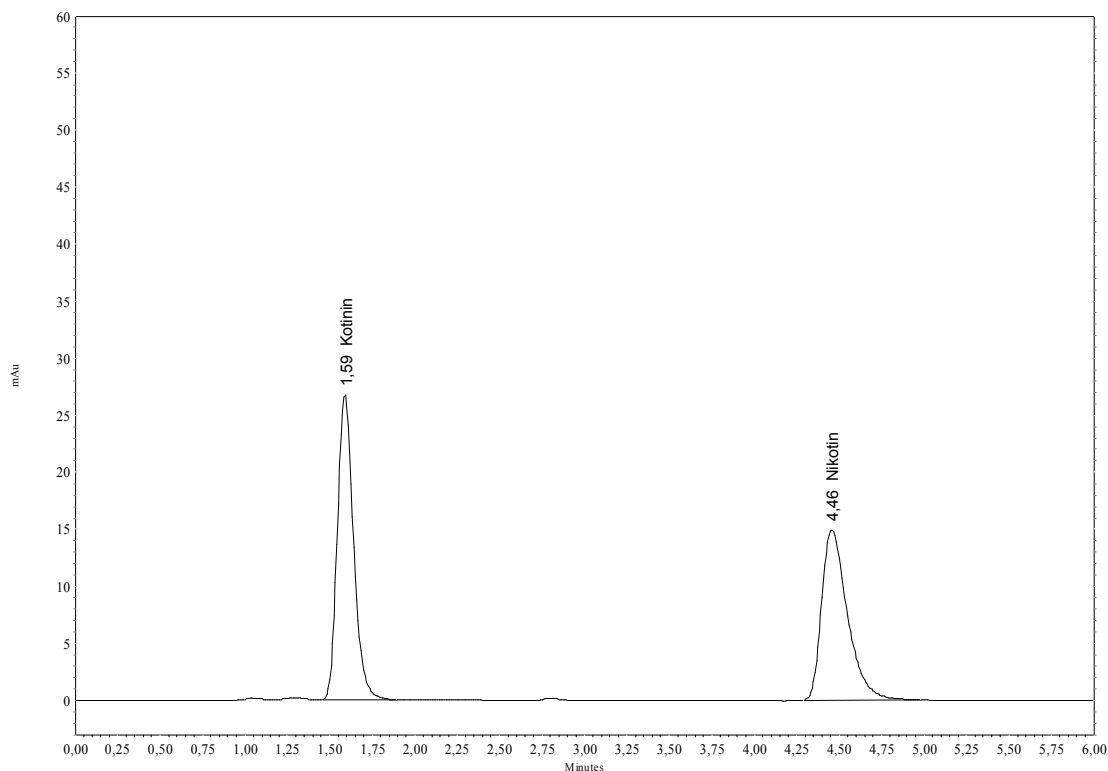
Složení mobilní fáze	pH pufru	Retenční čas (min)		Faktor symetrie		Rozlišení
		kotinin	nikotin	kotinin	nikotin	
acetonitril:octanový pufr = 50 : 50	7	0,97	2,49	1,20	1,72	9,61
acetonitril:octanový pufr = 50 : 50	5	0,97	2,62	1,29	1,38	-
acetonitril:octanový pufr = 50 : 50	3	1,09	2,27	1,24	1,18	3,97

- HPLC kolona XTerra®MS C18, 100 x 4,6 mm, 3,5 µm

Na této koloně byla testována mobilní fáze acetonitril:acetátový pufr (10 mM) = 20 : 80 (v/v). PH acetátového pufru bylo upraveno triethylaminem na pH 9. Jednotlivé píky byly od sebe dostatečně rozlišeny a doba analýzy byla do 5 minut. Tato kolona a mobilní fáze byla tedy zvolena pro další analýzu.

Tabulka 6: HPLC kolona XTerra®MS C18, 100 x 4,6 mm, 3,5 µm

Složení mobilní fáze	Retenční čas (min)		Faktor symetrie		Rozlišení
	kotinin	Nikotin	kotinin	nikotin	
acetonitril:octanový pufr pH 9 = 20 : 80	1,59	4,46	1,12	1,47	3,54



Obrázek 6: Chromatogram roztoku nikotinu a kotininu při použití mobilní fáze acetonitril:acetátový pufr = 20 : 80 v/v (pH vodné složky upraveno na 9 triethylaminem). Průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, kolona XTerra[®] MS C18, 100 x 4,6 mm, 3,5 μm.

5.1.2. Výběr vnitřního standardu

Jako možný vnitřní standard byly zkoušeny tři sloučeniny - methylparaben, ethylparaben a trimetoprim. Vnitřním standardem byl zvolen trimetoprim, jehož pík byl mezi kotininem a nikotinem ($t_{R\text{trimetoprim}} = 3,68$ min) a byl od těchto analyzovaných látek dokonale separován.

5.2. Validace metody

5.2.1. Test vhodnosti chromatografického systému

5.2.1.1. Účinnost chromatografické kolony (počet pater) N

Byl měřen standardní roztok (nikotin 7 mg/100 ml, kotinin 3,2 mg/100 ml, trimetoprim 4 mg/100 ml) připravený podle kap. 4.3.5. Pro výpočet byl použit vzorec dle ČL 2009⁵:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

t_R = retenční čas (min)

W_h = šířka píku v polovině jeho výšky (min)

Tabulka 7: Účinnost chromatografické kolony

Analyzovaná látka	Počet pater N
kotinin	1172
nikotin	4359

Počet měření n: 3

5.2.1.2. Faktor symetrie (A_s)

Byl měřen standardní roztok (nikotin 7 mg/100 ml, kotinin 3,2 mg/100 ml, trimetoprim 4 mg/100 ml) připravený podle kap.4.3.5. Pro výpočet byl použit vzorec dle ČL 2009⁵:

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

$W_{0,05}$ = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Tabulka 8: Faktor symetrie (A_S)

Analyzovaná látka	Faktor symetrie (A_S)
kotinin	1,2
nikotin	1,5

Počet měření n: 6

Požadavek: $A_S = 0,5-1,5$

5.2.1.3. Rozlišení chromatografických píků (R_S)

Byl měřen standardní roztok (nikotin 7 mg/100 ml, kotinin 3,2 mg/100 ml, trimetoprim 4 mg/100 ml), který byl připraven dle kap.4.3.5. Pro výpočet byl použit vzorec dle ČL 2009⁵:

$$R_S = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

t_R = retenční čas složek (min)

W_h = šířka píku v poloviční výšce (min)

Tabulka 9: Rozlišení chromatografických píků (R_S)

Hodnocené látky	Rozlišení chromatografických píků (R_S)
kotinin – trimetoprim	9,95
trimetoprim – nikotin	3,15

Počet měření n: 6

Požadavek: $R_S > 1,5$

5.2.1.4. Opakovatelnost analýzy

Roztok analyzovaných látek byl opakovaně dávkován v koncentraci:

Nikotin 15,3 mg/100 ml

Kotinin 7,8 mg/100 ml

Trimetoprim 4,8 mg/100 ml

Tabulka 10: Opakovatelnost analýzy – nikotin

Nikotin		
Číslo pokusu	Plocha píku (A)	Retenční čas (t_R) (min)
1	393644	4,48
2	395162	4,48
3	393959	4,49
4	393493	4,47
5	394498	4,47
6	395960	4,48

Počet měření n:	6	6
Aritmetický průměr x:	394452,7	4,48
SD:	958,736	0,008
RSD (%):	0,24	0,17

Požadavek: RSD < 1 %

Tabulka 11: Opakovatelnost analýzy – kotinin

Kotinin		
Číslo pokusu	Plocha píku	Retenční čas (t_R) (min)
1	150607	1,58
2	150909	1,58
3	150939	1,58
4	150895	1,58
5	150830	1,58
6	150866	1,58

Počet měření n:	6	6
Aritmetický průměr x:	150841	1,58
SD:	120,537	0
RSD (%):	0,08	0

Požadavek: RSD < 1 %

5.2.2. Validace analytické metody

5.2.2.1. Přesnost

Byly analyzovány roztoky vzorku Nicostar 15 ml nicotine spray, šarže 2331, které byly paralelně připraveny samostatným postupem uvedeným v kap. 4.3.9. Plochy píků uvedené v tabulce 12 jsou průměrem ze tří měření.

Tabulka 12: Přesnost

Roztok č.	Plocha píku nikotinu
1	241290
2	242893
3	234774
4	232891
5	232216
6	235884

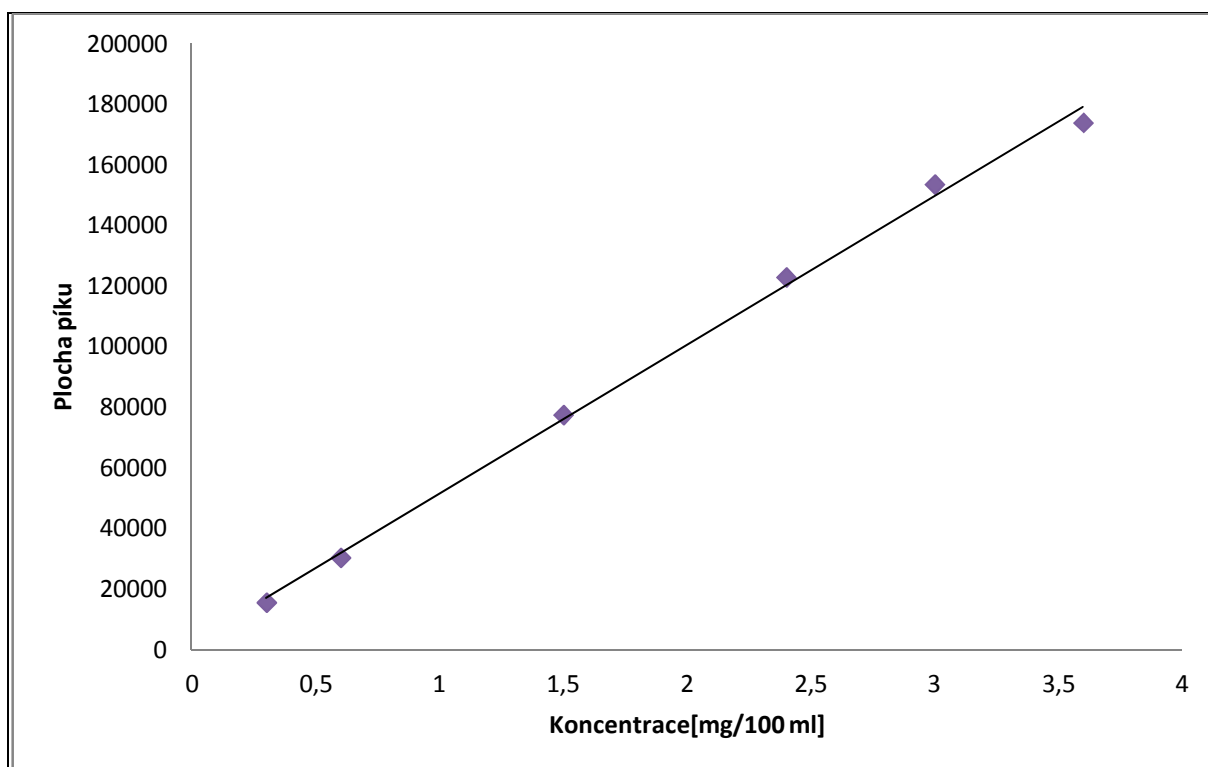
Počet měření n:	6
Aritmetický průměr x:	236659
SD:	4436,014
RSD (%):	1,87
Požadavek:	RSD < 5 %

5.2.2.2 Linearita

Pro hodnocení linearity bylo připraveno 6 kalibračních roztoků pracovních standardů kotininu a nikotinu dle kap. 4.3.15. Každý roztok byl dávkován na kolonu třikrát a pro následný výpočet byly použity průměry ploch. Závislost plochy na koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese za pomoci Excel šablony. Závislost pro kotinin je vyobrazena na obrázku 7 a pro nikotin na obrázku 8.

Tabulka 13: Závislost plochy na koncentraci kotininu v roztoku

Plocha píku	Koncentrace [mg/100 ml]					
	0,3	0,6	1,5	2,4	3	3,6
Plocha 1	16005	29979	76843	122846	152995	173331
Plocha 2	15973	30026	77435	122323	153182	174224
Plocha 3	14918	31155	78138	123454	154458	173979
Průměr	15632	30387	77472	122874	153545	173845



Obrázek 7: Graf závislosti plochy na koncentraci kotininu v roztoku

Regresivní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů n: 6

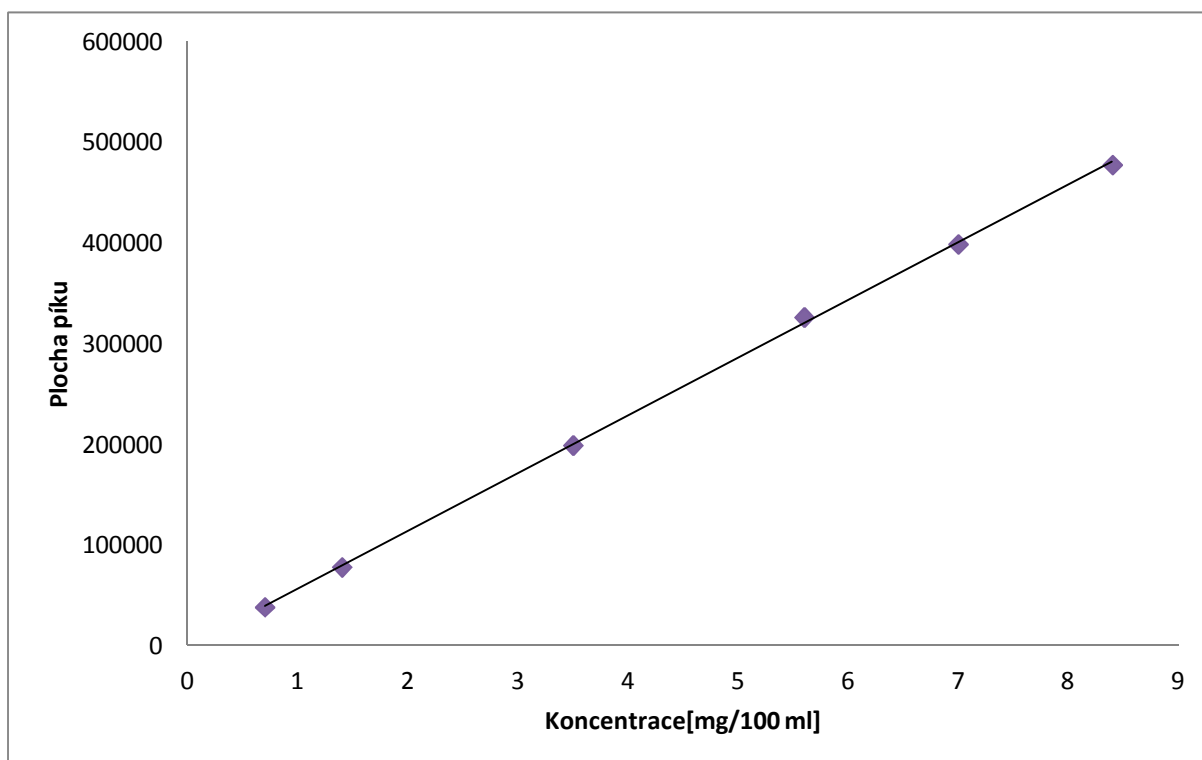
Parametry regresní přímky

$$y = 49129x + 2280,7$$

koeficient korelace R: 0,9973

Tabulka 14: Závislost plochy na koncentraci nikotinu v roztoku

Plocha píku	Koncentrace [mg/100 ml]					
	0,7	1,4	3,5	5,6	7	8,4
Plocha 1	39192	77653	198867	326938	398326	476468
Plocha 2	39921	79328	201076	325689	400303	479755
Plocha 3	37035	78442	198428	327106	398613	477577
Průměr	38716	78478	199457	326578	399081	477933



Obrázek 8: Graf závislosti plochy na koncentraci nikotinu v roztoku

Regresivní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů n: 6

Parametry regresní přímky

$$y = 57291x - 615,02$$

koeficient korelace R: 0,9997

5.2.2.3. Správnost

Byla použita metoda standardního přidavku, kdy ke vzorkům byl přidáván standard nikotinu (viz kapitoly 4.3.12., 4.3.13. a 4.3.14.). Výtěžnost R_i (%) byla vypočítána podle vzorce:

$$R_i (\%) = 100 * \frac{x_i - x_v}{x_0}$$

x_i = množství nikotinu zjištěného ve vzorku po přidání standardu nikotinu (mg)

x_0 = množství nikotinu přidaného ke vzorku (mg)

x_v = množství nikotinu ve vzorku (bez přidavku standardu) zjištěného při analýze (mg)

Tabulka 15: Správnost Nicostar

Nicostar				
Číslo pokusu	x_i (mg)	x_0 (mg)	x_v (mg)	R_i (%)
1	1,849	0,875	1,005	96,46
2	1,748	0,875	0,901	96,80
3	1,773	0,875	0,940	96,20
4	1,830	0,875	0,956	99,89
5	1,809	0,875	0,974	95,42
6	1,758	0,875	0,914	96,45

Počet měření n: 6

Aritmetický průměr \bar{x} : 96,87

SD: 1,55

RSD (%): 1,6

Požadavek: R_i v intervalu 100 ± 5 %; $RSD \leq 5$ %

Tabulka 16: Správnost Tobacco Blue

Tobacco Blue				
Číslo pokusu	x_i (mg)	x_0 (mg)	x_v (mg)	R_i (%)
1	1,935	0,875	1,029	103,54
2	1,902	0,875	1,028	99,89
3	1,860	0,875	0,998	98,51

Počet měření n: 3

Aritmetický průměr \bar{x} : 100,64

SD: 2,60

RSD (%): 2,58

Požadavek: R_i v intervalu $100 \pm 5 \%$; $RSD \leq 5 \%$

Tabulka 17: Správnost Desert Ship

Desert Ship				
Číslo pokusu	x_i (mg)	x_0 (mg)	x_v (mg)	R_i (%)
1	2,397	0,875	1,561	95,54
2	2,409	0,875	1,577	95,09
3	2,477	0,875	1,634	96,34

Počet měření n: 3

Aritmetický průměr \bar{x} : 95,66

SD: 0,63

RSD (%): 0,66

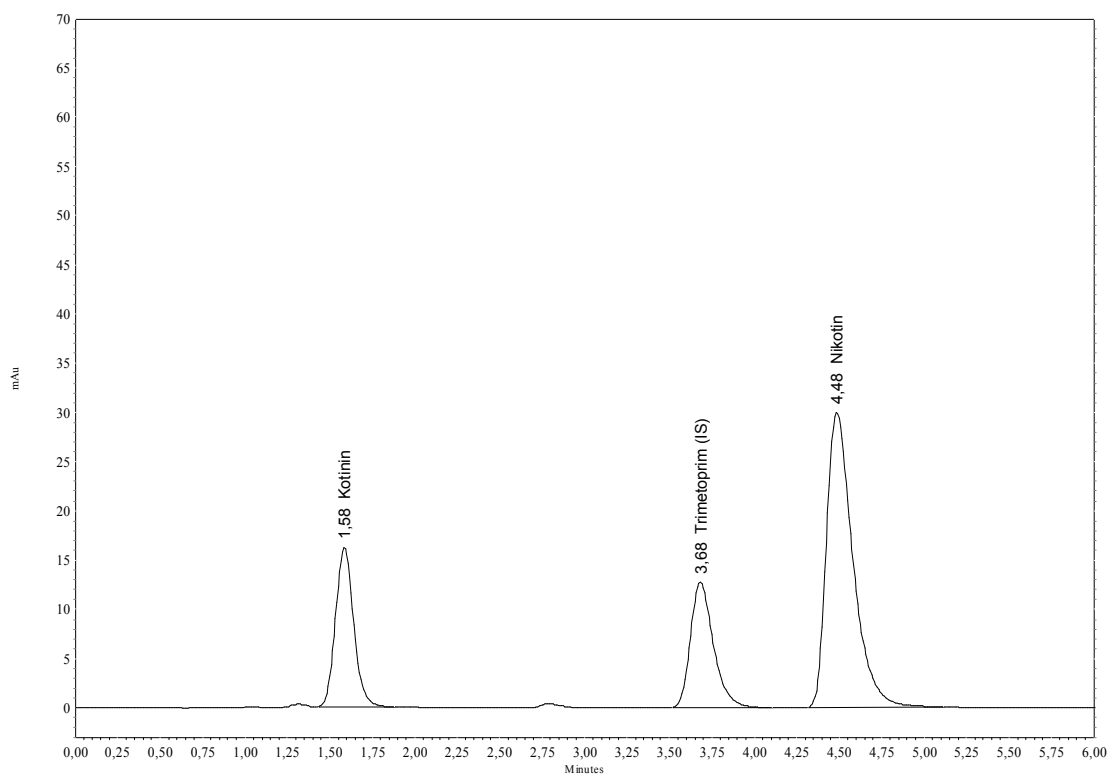
Požadavek: R_i v intervalu $100 \pm 5 \%$; $RSD \leq 5 \%$

5.2.2.4. Selektivita

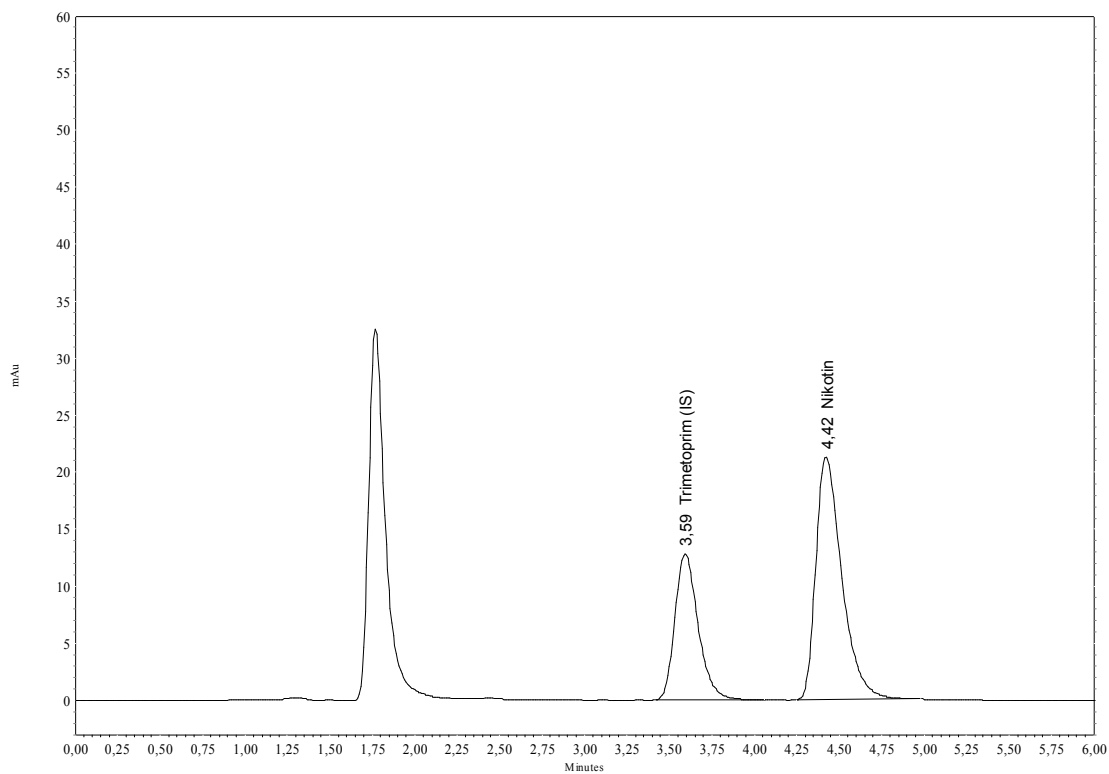
Separace roztoku nikotinu ($c = 5,6 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) a kotininu ($c = 2,4 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) s přídavkem vnitřního standardu trimetoprimu ($c = 2 \text{ mg}/100 \text{ ml}$) je zobrazena na prvním chromatogramu. (Obrázek 9)

Další tři chromatogramy zobrazují analýzy roztoků přípravků Nicostar, Tobacco Blue a Desert Ship s přídavkem vnitřního standardu trimetoprimu připravené dle kapitol 4.3.9., 4.3.10. a 4.3.11.

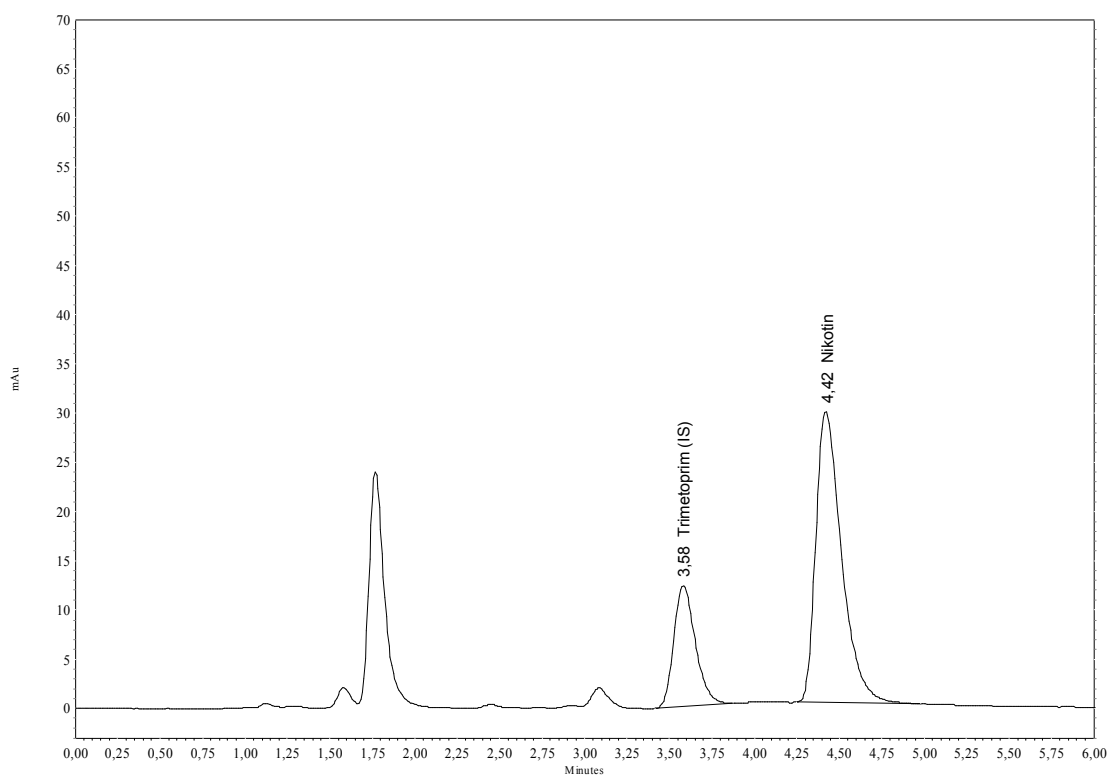
Použitá HPLC metoda tedy umožňuje selektivně stanovit obsah nikotinu ve vybraných náplních do elektronických cigaret a v nikotinovém ústním spreji.



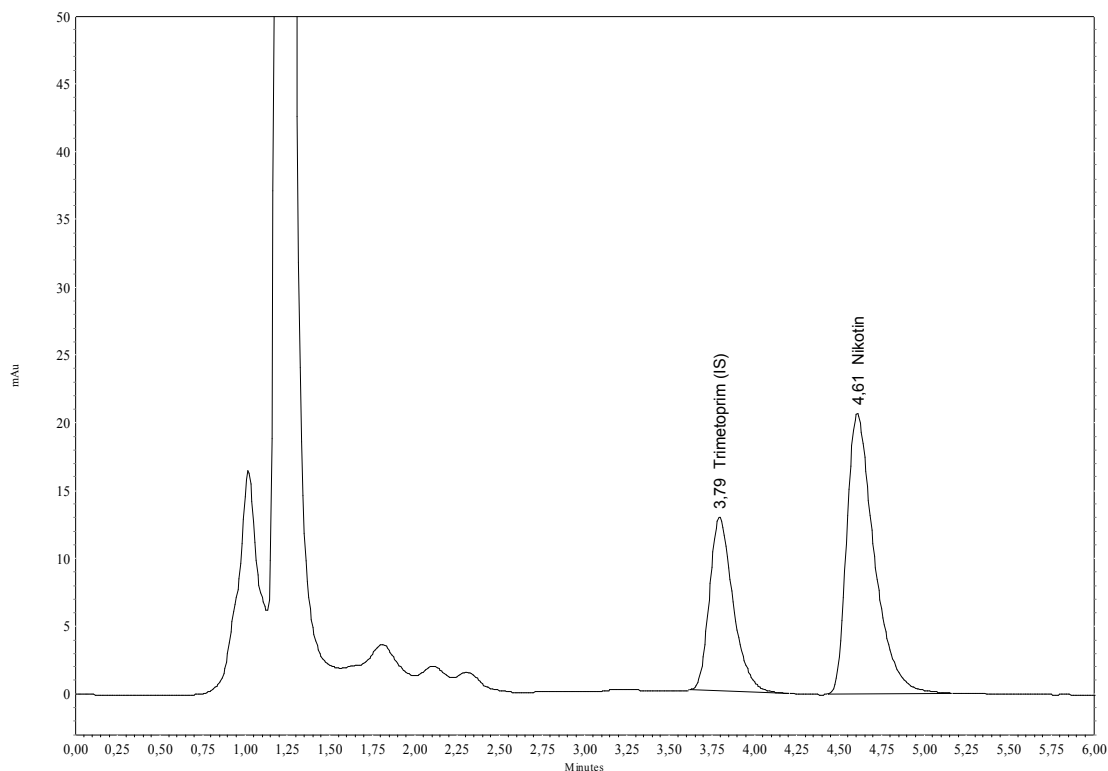
Obrázek 9: Chromatogram roztoku nikotinu a kotininu s přídavkem vnitřního standardu.



Obrázek 10: Chromatogram přípravku Tobacco Blue s přidavkem vnitřního standardu.



Obrázek 11: Chromatogram přípravku Desert Ship s přidavkem vnitřního standardu.



Obrázek 12: Chromatogram přípravku Nicostar sprej s přidavkem vnitřního standardu.

5.2.2.5. Robustnost

Byl testován vliv experimentálních podmínek na stanovení obsahu kotininu a nikotinu. Pro hodnocení byl použit standardní roztok (nikotin 7 mg/ 100 ml, kotinin 3,2 mg/ 100 ml, trimetoprim 4 mg/ 100 ml) připravený dle kap. 4.3.5.

5.2.2.5.1. Vliv složení mobilní fáze

Vliv složení mobilní fáze byl testován při třech různých poměrech acetonitril: octanový pufr pH 9 = 15 : 85, 20 : 80, 25 : 75.

- a) Vliv na retenční čas je zobrazen v tabulce 18. Při zvyšování podílu acetonitrilu došlo ke zkrácení trvání analýzy. Oproti tomu snižování podílu acetonitrilu vedlo k prodloužení analýzy, což je při stanovení nežádoucí. Navíc nedocházelo k separaci trimetoprimu a nikotinu.

Tabulka 18: Vliv složení mobilní fáze na retenční čas

acetonitril: octanový pufr	Kotinin	trimetoprim	nikotin
	t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)
15 : 85	2,04	7,78	7,78
20 : 80	1,58	3,67	4,46
25 : 75	1,36	2,31	3,04

- b) Vliv na plochu chromatografického píku A_i a relativní plocha A_R (%) je uvedena v tabulce 19. Relativní plocha je vztažena na plochu píku při optimálním složení mobilní fáze a byla vypočítána dle vzorce:

$$A_R = \frac{A_i}{A_{20:80}} \cdot 100$$

Relativní plocha A_R (%) se pohybovala v rozmezí 99,63 % až 101,92 %. Změny v poměru složek mobilní fáze v uvedeném rozmezí ovlivňují tedy stanovení kotininu, trimetoprimu a nikotinu jen velmi málo.

Tabulka 19: Vliv složení mobilní fáze na plochu píku

acetonitril: octanový pufr	Kotinin		trimetoprim		nikotin	
	A_i	A_R (%)	A_i	A_R (%)	A_i	A_R (%)
15: 85	191439	100,24	-	-	-	-
20:80	190973	100,00	116556	100,00	388266	100,00
25:75	194644	101,92	116131	99,63	387781	99,87

5.2.2.5.2 Vliv hodnoty pH octanového pufru

Standardní roztok byl měřen při třech různých hodnotách pH octanového pufru: 8,5; 9 a 9,5.

- a) Vliv na retenční čas je zobrazen v tabulce 20. Snižováním hodnoty pH došlo ke snížení retenčního času nikotinu a ke zvýšení retenčního času trimetoprimu. Při

zvýšeném pH došlo naopak k urychlení analýzy kotininu a trimetoprimu a ke zvýšení retenčního času nikotinu.

Tabulka 20: Vliv hodnoty pH octanového pufru na retenční čas

pH octanového pufru	Kotinin	trimetoprim	nikotin
	t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)
8,5	1,58	3,69	4,00
9	1,58	3,67	4,46
9,5	1,56	3,63	4,49

- b) Vliv na plochu chromatografického píku A_i a relativní plocha A_R (%) je uvedena v tabulce 21. Relativní plocha je vztažena na plochu píku při optimálním pH octanového pufru a byla vypočítána dle vzorce:

$$A_R = \frac{A_i}{A_{pH\ 9}} \cdot 100$$

Relativní plocha A_R (%) se pohybovala v rozmezí 98,37 % až 100,82 %. Vzhledem k velmi malým změnám ploch píků nemají tyto hodnoty pH rozhodující vliv na analýzu.

Tabulka 21: Vliv hodnoty pH octanového pufru na plochu píku.

pH octanového pufru	Kotinin		trimetoprim		nikotin	
	A_i	A_R (%)	A_i	A_R (%)	A_i	A_R (%)
8,5	190209	99,60	114663	98,37	382229	98,46
9	190973	100,00	116556	100,00	388266	100,00
9,5	192540	100,82	114961	98,63	389940	100,43

6. Shrnutí závěrů práce

V této diplomové práci byla vypracována HPLC metoda pro stanovení obsahu nikotinu v ústním spreji a v náplních do elektronických cigaret.

Při vývoji metody bylo testováno 5 chromatografických kolon, z nichž jako optimální byla zvolena kolona XTerra[®]MS C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 μ m). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a 10mM octanu amonného v poměru 20 : 80 (v/v), pH vodné složky bylo upraveno triethylaminem na hodnotu 9. Detekce byla provedena při vlnové délce 260 nm a jako vnitřní standard byl použit trimetoprim.

Zvolené chromatografické podmínky umožňují současně stanovit nikotin i jeho příbuznou látku kotinin. Při analýze ústního spreje a vybraných náplní do elektronických cigaret je ovšem stanovení kotininu rušeno pomocnými látkami v přípravcích, takže HPLC metoda byla validována pouze pro stanovení nikotinu.

Z výsledků validace je patrné, že zvolená metoda poskytuje přesné a správné výsledky, takže je vhodná pro stanovení nikotinu v ústním spreji a ve vybraných náplních do elektronických cigaret.

7. Seznam zkratek

CAS	Chemical Abstracts Service
CNS	Centrální nervová soustava
C8 kolona	Silikagelová kolona s osmi uhlíkatým postranním řetězcem
C18 kolona	Silikagelová kolona s osmnácti uhlíkatým postranním řetězcem
ČL 2009	Český lékopis 2009
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
M_r	Relativní molekulová hmotnost
NRT	Náhradní nikotinová terapie
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UV	Ultrafialová oblast spektra
UV-VIS	Oblast ultrafialového a viditelného spektra

8. Použitá literatura

- [1] Klimeš, J. et al. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. 265 s. ISBN 978-80-87009-29-1.
- [2] Coufal, Pavel. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. [online]. [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
- [3] Karlíček, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*, 3. vydání, Praha: Karolinum, 2009. 282 s. ISBN 978-80-246-1453-3.
- [4] http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chromatografie_kapalinova_vysoceucinna.html (04/2014)
- [5] Český lékopis 2009. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [6] Nicotine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. Wikipedia Foundation, 8. February 2002, last modified on 21 February 2014 [cit. 2014-02-21]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotine>.
- [7] Lüllmann, H. - Mohr, K. - Hein, L. *Barevný atlas farmakologie*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007. 384 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- [8] Cotinine. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. Wikipedia Foundation, 30. June 2004, last modified on 4 February 2014 [cit. 2014-02-21]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Cotinine>
- [9] Králíková, Eva. Nové možnosti v léčbě závislosti na tabáku. *Interní medicína pro praxi*. 2008, č. 10, s. 444-448. ISSN: 1803-5256. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2008/10/03.pdf>
- [10] Lüllmann, H. - Mohr, K. - Wehling, M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 728 s. ISBN 978-80-247-0836-1.
- [11] Čupka, J. et al. Léčba závislosti na tabáku v ordinaci praktického lékaře, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2005. ISBN 80-903573-7-7. Dostupné z: http://www.svl.cz/Files/nastenka/page_4766/Version1/Lecba-zavislosti-na-tabaku.pdf

- [12] Hartl, J. et al. *Farmaceutická chemie II/I*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1997. 106 s. ISBN 80-7184-349-0
- [13] Yasuda, M. et al. Simultaneous determination of nicotine and cotinine in serum using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system. *Journal of Chromatography B*. 2013, č. 934, s. 41-45.
- [14] Králíková, Eva. Léčba závislosti na tabáku, náhradní terapie nikotinem a kardiovaskulární onemocnění. *Časopis Remedia*. 2006, č.3/2006. Dostupné z: <http://www.remedia.cz/Okruhy-temat/Farmako-epidemiologie/Lecba-zavislosti-na-tabaku-nahradni-terapie-nikotinem-a-kardiovaskularni-onemocneni/8-Y-f9.magarticle.aspx>
- [15] <http://nicostar.com/> (04/2014)
- [16] Tonnesen, P. et al. Efficacy of a nicotine mouth spray in smoking cessation: a randomised double blind trial. *European respiratory Journal*. 2012, č. 40, s. 548-554.
- [17] Hansson, A. et al. Effects of nicotine mouth spray on urges to smoke, a randomised clinical trial, *BMJ Open*. 2012, vol. 2, issue 5. pii: e001618. ISSN: 2044-6055 doi: 10.1136/bmjopen-2012-001618. Dostupné z: <http://bmjopen.bmj.com/content/2/5/e001618.full?sid=a3611b31-dafb-4585-8f55-5851592c1518> (04/2014)
- [18] *Informace Ministerstva zdravotnictví k uvádění elektronických cigaret na trh* [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR, 27. 8. 2013, poslední úprava 5. 9. 2013 [cit. 2014-02-26]. Dostupné z: http://www.mzcr.cz/obsah/tabak-a-elektronicke-cigarety_2989_1.html
- [19] Electronic cigarette. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. Wikipedia Foundation, 28. 6. 2007, last modified on 25 February 2014 [cit. 2014-02-26]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Electronic_cigarette
- [20] *Questions and answers on electronic cigarettes or electronic nicotine delivery systems (ENDS)* [online]. World Health Organization, 9. 7. 2013 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: http://www.who.int/tobacco/communications/statements/eletronic_cigarettes/en/

- [21] Dawkins, L. et al. The electronic-cigarette: Effect on desire to smoke, withdrawal symptoms and cognition. *Addictive behaviors*. 2012, č. 37, s. 970-973.
- [22] Bullen, Ch. et al. Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2013, č. 382, s. 1629-1637.
- [23] Chang, Y. - L. et al. Simultaneous determination of nicotine and its metabolite, cotinine, in rat blood and brain tissue using microdialysis coupled with liquid chromatography: Pharmacokinetic application. *Journal of Chromatography A*. 2005, č. 1088, s. 152-157.
- [24] Doctor, P. B. et al. Determination of nicotine and cotinine in tobacco harvesters' urine by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2004, č. 802, s. 323-328.
- [25] Tambwekar, K. R. - Kakariya, R. B. - Garg, S. A validated high performance liquid chromatographic method for analysis of nicotine in pure form and from formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, č. 32, s. 441-450.
- [26] Nakajima, M. et al. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2000, č. 742, s. 211-215.
- [27] Oddeze, C. - Pauli, A. M. - Pastor, J. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nicotine and cotinine in nonsmoker human and rat urines. *Journal of Chromatography B*. 1998, č. 708, s. 95-101.
- [28] Page-Sharp, M. et al. Measurement of nicotine and cotinine in human milk by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*. 2003, č. 796, s. 173-180.