

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

STANOVENÍ TOKOFEROLŮ V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU
(rešeršní práce)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2015

Bc. Jana Koutová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za její neustálý vstřícný přístup, trpělivost a cenné rady po celou dobu vypracovávání této práce.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

.....

Obsah

1. ABSTRAKT	6
2. ABSTRACT	7
3. CÍL PRÁCE.....	8
4. ÚVOD.....	8
5. TEORETICKÁ ČÁST.....	9
5.1 Biologická funkce vitamínu E	9
5.2 Metabolismus vitamínu E.....	10
5.3 Chemická struktura vitamínu E	12
5.4 Stabilita a biologická účinnost jednotlivých struktur	13
5.5 Fyzikální vlastnosti vitamínu E	14
5.6 Metody stanovení vitamínu E	15
5.6.1 Chromatografie	15
5.6.2 Kapilární elektrochromatografie	26
5.6.3 Spektrofotometrie.....	28
5.6.4 Imunochemické metody	28
5.7 Úprava (biologického) vzorku	29
6. PRAKTICKÉ MOŽNOSTI STANOVENÍ	32
6.1 Stanovení vitamínu E chromatografickými metodami.....	32
6.1.1 Současné stanovení vitamínu A a E v lidské plasmě pomocí přepínání kolon s on-line extrakcí [49].....	32
6.1.2 Současné stanovení vitamínu A a E v lidském séru metodou HPLC [50]	33
6.1.3 Stanovení vitamínu A a α -tokoferolu v mateřském mléce pomocí core-shell technologie částic [51]	33
6.1.4 Stanovení vitamínu E v mateřském mléce s/bez předchozího zmýdelnění pomocí HPLC-UV [52].....	34
6.1.5 Analýza tokoferolů a tokotrienolů včetně jejich metabolitů v různých myších a lidských biologických materiálech [53]	35
6.1.6 Analýza mleziva a mateřského mléka metodou UHPLC [54]	36
6.1.7 Stanovení vitamínu E metodou GC po derivatizaci v séru a plodové vodě [55]	38

6.1.8	Stanovení tokoferolů, tokotrienolů a jejich metabolitů metodou HPLC-MS na normální fázi [56]	40
6.1.9	Separace a kvantifikace všech izoform tokoferolů a tokotrienolů v myších játrech a lidské plasmě metodou HPLC na reverzní fázi[57].....	41
6.2	Spojení imunochemické přípravy vzorku s HPLC analýzou	42
6.2.1	Vitamin A and Vitamin E HPLC Assay [58].....	42
6.3	Spektrofotometrická stanovení	43
6.3.1	Modifikace spektrofotometrické metody na mikrodestičkách [59]	43
6.4	Imunochemické metody	43
6.4.1	Vitamin E ELISA kit [60]	43
6.5	Kapilární elektrochromatografie (CEC)	44
6.5.1	Separace α -, γ - a δ -tokoferolů metodou CEC s náplňovou kapilárou [37].....	44
6.5.2	Separace α -, β -, γ - a δ -tokoferolů metodou CEC s monolitní kapilárou [61]...	44
7.	VÝSLEDKY.....	45
8.	ZÁVĚR	48
9.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	49
10.	SEZNAM TABULEK	51
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
12.	POUŽITÁ LETERATURA.....	53

1. ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit přehled laboratorních metod používaných pro stanovení vitamínu E v biologických matricích. Vitamín E je důležitým antioxidantem a jeho deficit je spojován se závažnými kardiovaskulárními, nervovými a imunitními onemocněními. Četnost jeho stanovení se v posledních letech zvyšuje, u metod je kladen důraz na rychlost, univerzálnost a možnost automatizace.

Teoretická část je věnována chemickým, fyzikálním vlastnostem a biologické funkci. Tyto poznatky jsou důležité jako úvod pro pochopení funkce vitamínu v organismu a jeho chemicko-fyzikální podstata pro volbu metod stanovení.

Mezi hlavní metody stanovení je možno zařadit především chromatografické metody (UHPLC, HPLC, GC) a dále metody elektrochromatografické (CEC) a spektrofotometrické. V závěru práce jsou uvedené metody porovnány z různých hledisek.

Klíčová slova: tokoferoly, vitamín E, biologický materiál.

2. ABSTRACT

The aim of this diploma thesis is to create the list of laboratory methods used for the determination of vitamin E in biological materials. Vitamin E is important antioxidant and its deficit is connected with major cardiovascular, neural and immunity disorders. The frequency of its determination is increasing in the last years; the emphasis is put on the speed, universality and possibility of automation.

Theoretical part of this work is dealing with chemical and physical characteristics and biological function of vitamin E. These findings are important to understand the role of vitamin E in the organism and also important for choice of determination method.

The main methods of analysis are chromatographic (UHPLC, HPLC, GC), electrochromatographic (CEC) as well as spectrofotometric methods. The comparison of used methods is also included in the diploma thesis.

Key words: tocopherols, vitamin E, biological material.

3. CÍL PRÁCE

Úkolem této práce bylo zpracovat přehled současných metod umožňujících stanovení vitamínu E v biologických matricích.

4. ÚVOD

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které si heterotrofní organizmus dokáže syntetizovat jen v omezené míře. Většinu potřebného množství musí však člověk přijímat potravou. Existuje 13 základních druhů vitamínů. Vitamíny lze rozdělit do dvou skupin, hydrofilní a lipofilní. Některé jsou do těla vstřebávány z potravy ve formě provitamínu. Tento neaktivní prekurzor je typický např. pro beta-karoten/retinol [1].

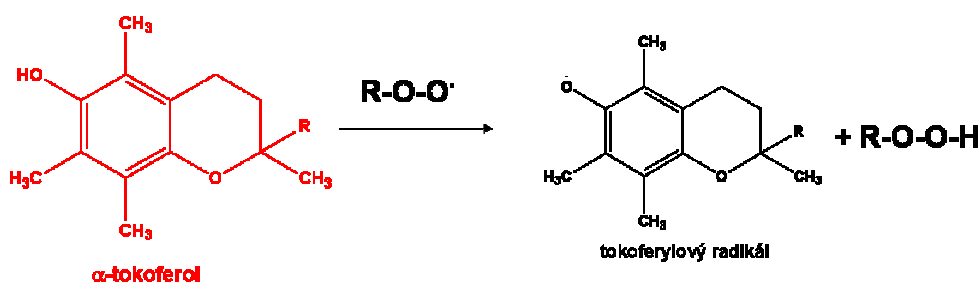
Vitamín E, společně s vitamíny A, D a K, patří mezi rozpustné v tucích. Je nezbytný pro metabolismus, ve kterém funguje jako katalyzátor biochemických reakcí [2]. Důležitý je ale také pro imunitu, nervový systém, a také při prevenci a léčbě kardiovaskulárních a onkologických onemocněních [3]. Tato onemocnění jsou natolik závažná, že se v současné době věnuje stanovení a působení vitamínu E stále více odborných studií.

Ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení se používají moderní analytické metody. Mezi ně je možné zařadit především ultravysokoúčinnou -, vysokoúčinnou kapalinovou -, plynovou chromatografii, kapilární elektrochromatografii, spektrofotometrická a imunochemická stanovení [4].

5. TEORETICKÁ ČÁST

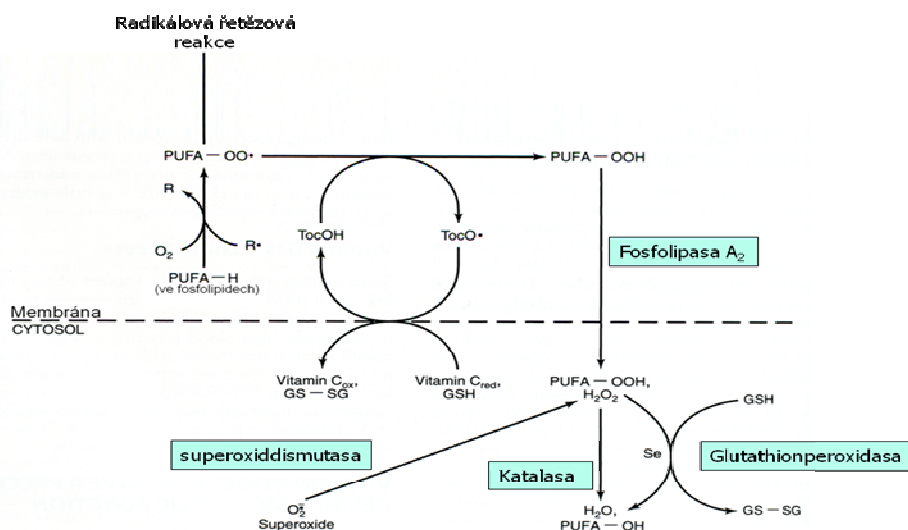
5.1 Biologická funkce vitamínu E

Vitamin E je nejvýznamnější intracelulární lipofilní antioxidant, který přerušuje řetězové reakce při peroxidaci lipidů [2]. Zařazuje se do membrán buněk všech tkání v blízkosti polynenasycených mastných kyselin membránových fosfolipidů a membránových enzymů (např. cytochrom P-450), které při detoxikaci škodlivých látek produkují volné radikály [2]. Redukce volných radikálů je zobrazena v rovnici (Obrázek 1).



Obrázek 1: Redukce volných radikálů [5]

α -tokoferol redukuje alkylperoxylový radikál $ROO\cdot$ na alkylhydroperoxid [5]



Obrázek 2: Systém antioxidantní ochrany buňky. Alkylhydroperoxid je redukován glutathionperoxidázou. α -tokoferol přechází na málo reaktivní tokoferylový radikál, který může reagovat s vitamínem C (regenerace), nebo reagovat s dalším volným alkylperoxylovým radikálem, kdy ale dochází k oxidaci tokoferolu nevratně a vzniklý

produkt je vyloučen žlučí. Alkylovou skupinou jsou v obrázku mastné kyseliny: PUFA-H = polynenasycená mastná kyselina, PUFA-OO• = peroxylový radikál polynenasycených mastných kyselin, PUFA-OOH = hydroperoxy polynenasycená mastná kyselina, PUFA-OH = hydroxypolynenasycená MK [5]

5.2 Metabolismus vitamínu E

Vstřebávání tokoferolů je úzce spojeno s metabolismem tuků. Jakákoliv porucha v jejich metabolismu může být příčinou hypovitaminózy. Vitamín E je vstřebáván enterocyty společně s tuky z potravy. Průměrně je vstřebáno jen cca 30% přijatého vitamínu. Míra vstřebání závisí také na povaze současně vstřebávaných tuků. Podporují ho nasycené mastné kyseliny triglyceridů se středně dlouhým řetězcem, inhibují naopak polynenasycené mastné kyseliny. Nepřiměřeně zvýšený příjem nezpůsobuje zvýšené vstřebávání. Přebytek tedy odchází nevyužitý s nestrávenou potravou [6,7].

Pro přenos enterocytem neexistuje žádný transportní protein. Vstřebaný vitamín E je transportován v podobě chylomikrů krevním oběhem nebo lymfou. Játry je převeden do VLDL částice, část může být uložena, ale největší část je přenášena transportním proteinem α TTP do tkání. Vitamín E si mezi sebou předávají i částice LDL a HDL. Mezi tkání a LDL existuje i zpětné vychytávání a začleňování vitamínu E do částice [5,8,9,10].

Zvýšenou afinitu k ukládání do membrány mají mitochondrie a endoplazmatické retikulum. 90% celkového množství je uloženo v adipocytech (tuková tkáň), dále pak v játrech, děloze a svalch. Přebytek je během týdne vyloučen žlučí nebo močí (kyselina tokoferová a gama-laktoglukuronidy) [11,12].

Nedostatek (hypovitaminóza) nebo totální nedostatek (avitaminóza) vzniká při genetických a metabolických chorobách (cystická fibróza, steatorhea, abetalipoproteinemie). Příčinou je u těchto nemocí porucha vstřebávání tuků nebo chronické onemocnění jater. Nedostatečné vstřebání hrozí také při dlouhodobé dietě s vyloučením tuků. Hypovitaminózu způsobují i některé léky a chemické látky, např. antikonvulziva, ethanol, fenobarbital, cholestyramin, karbamazepin a klofibrát [13].

Zvýšené sérové koncentrace nalezneme u hyperlipidemie, obstrukce jater, ledvinného selhání a v těhotenství [11].

Klinickými příznaky nedostatku vitamínu E pak bývají poruchy zraku a chůze, celková únava, suchá kůže, záněty v trávicím traktu, neplodnost, drobné nervové poruchy a špatné hojení ran. Laboratorním nálezem může být zvýšená agregabilita trombocytů, zvýšená fragilita erytrocytů, zvýšená clearance kreatininu se současným poklesem sérového kreatininu, morfologické změny periferních nervů. V extrémních případech vyvolává anemii ze zvýšeného rozpadu erytrocytů [11].

Nedostatek je však při běžné stravě velmi vzácný. Potraviny bohaté na vitamín E jsou např. rostlinné oleje (slunečnicový olej, ořechový olej, pšeničný olej), listová zelenina, vaječný žloutek a luštěniny. Doporučené denní dávky a fyziologické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1:

Doporučené dávky (mg α -tokoferolu/den)	
Ženy	8 - 10
těhotné ženy	13
ženy (věk > 50 let)	15
Muži	10
muži (věk > 50 let)	15

Tabulka 2:

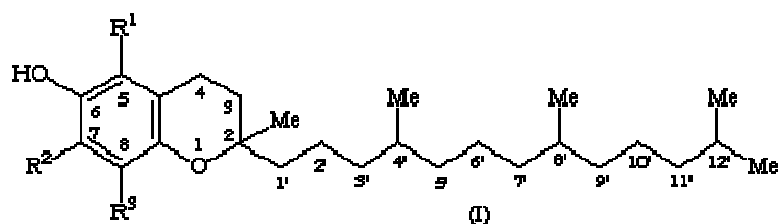
Vitamin E v séru fyziologické hodnoty	$\mu\text{mol/l}$
0 – 1 měsíc	8 – 28
1 – 6 měsíc	10 – 31
6 měsíců – 6 roků	20 – 30
Dospělý	19 – 35

Kolísání hodnot mezi jednotlivými dny je fyziologicky až 15 %. Referenční meze závisí na použité metodě. Hodnoty pod 11,5 $\mu\text{mol/l}$ jsou označovány jako deficit, 11,6-16,2 $\mu\text{mol/l}$ jako hypovitaminóza. Až hodnota nad 30 $\mu\text{mol/l}$ může být označována jako protektivní proti kardiovaskulárním onemocněním. Interpretace antioxidantní ochrany

ovšem nezahrnuje jen vitamín E, ale v potaz se musí brát i hladiny vitamínu C (nad 50 $\mu\text{mol/l}$) a beta-karotenu (nad 0,4 $\mu\text{mol/l}$) [11,13].

5.3 Chemická struktura vitamínu E

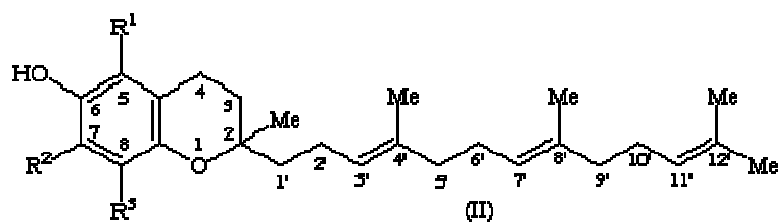
Struktura α -tokoferolu byla objevena v roce 1938. Byl považován za nejsilnější antioxidant. V následujících letech ale byla objevena celá skupina strukturně podobných sloučenin s kvalitativně srovnatelnou biologickou aktivitou scavengerů. Vitamínem E je tedy označována skupina osmi izomerů, 4 tokoferolové (α -, β -, γ -, δ -) a čtyři tokotrienolové (α -, β -, γ -, δ -). Společně je tvoří chromanový kruh a vedlejší nasycený (tokoferoly) nebo nenasyčený (tokotrienoly) hydrofobní izoprenoidní řetězec, označujeme jako tocol [14,15].



Obrázek 3: **tocol**= 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl) chroman-6-ol (I, R 1 = R 2 = R 3 = H) [14]

Tabulka 3: **Tokoferoly**= všechny mono-, di-a trimethyl**tokoly** [14]

	R 1	R 2	R 3	
α -tokoferol	Me	Me	Me	5,7,8-trimethyltokol
β -tokoferolu	Me	H	Me	5,8-dimethyltokol
γ -tokoferol	H	Me	Me	7,8-dimethyltokol
δ -tokoferol	H	H	Me	8-methyltokol

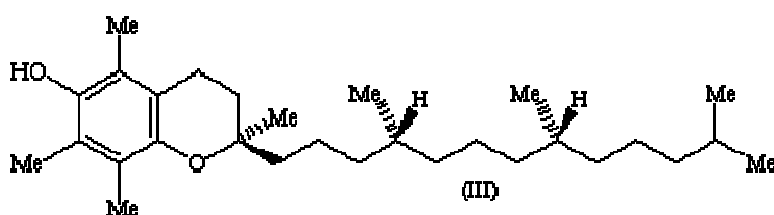


Obrázek 4: **tokotrienol**= (R 1 = R 2 = R 3 = H), a v pozici 3,7,11 je na fitylovém konci dvojná vazba: 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltrideca-3,7,11-trienyl) chroman-6-ol [14]

Tabulka 4: **Tokotrienoly** =všechny mono-, di-a trimethyl**tokotrienoly** [14]

	R 1	R 2	R 3	
α -tokotrienol	Me	Me	Me	5,7,8-trimethyltocotrienol
β -tokotrienol	Me	H	Me	5,8-dimethyltocotrienol
γ -tokotrienol	H	Me	Me	7,8-dimethyltokotrienol
δ -tokotrienol	H	H	Me	8-methyltokotrienol

α -tokoferol z přírodních zdrojů existuje pouze v jedné konfiguraci (R 2, R 4', R 8') a je označován jako RRR- α -tokoferol nebo d- α -tokoferol:



Obrázek 5: d- α -tokoferol [14]

Ostatní stereoizomery α -tokoferolu jsou vyrobeny synteticky [14].

5.4 Stabilita a biologická účinnost jednotlivých struktur

Vitamin E ztrácí svoji aktivitu oxidací vzdušným kyslíkem, působením světla a rafinací při průmyslovém zpracování rostlinných olejů. Rafinací se ztrácí až 70 %.

Největší biologickou aktivitu má v organismu RRR- α -tokoferol, a účinnost klesá s počtem methylových skupin na postranním řetězci. Tedy aktivita α -tokoferolu byla ustanovena jako 100 %, a poté klesá v poměru: 100:40:8:1 (α : β : γ : δ). Pro větší přesnost by bylo užitečné výsledky analýzy množství jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů, jak v krvi, tak v krmivech a potravinách přepočítat podle jejich biologické účinnosti. Další možností je vyjádření v hmotnostních nebo mezinárodních jednotkách uvedených v Tabulce 5 [16,17,18,19].

Tabulka 5 [16]:

1IU vitamin E	=	1 mg D,L-alfa-tokoferol acetát
1 mg alfa-tokoferol acetát	=	0,91 mg alfa-tokoferol
1 mg D-alfa-tokoferol acetát	=	1,36 IU vitamin E

1 mg D,L-alfa-tokoferol	=	1,1 IU vitamin E
1 mg D-alfa-tokoferol	=	1,49 IU vitamin E
1 tokoferolekvivalent TE	=	1 mg D-alfa-tokoferol
1 tokoferolekvivalent TE	=	1,49 mg D,L-alfa-tokoferol acetát

5.5 Fyzikální vlastnosti vitamínu E

Přírodně se vyskytující tokoferoly mají 3 centra chiraloty, na uhlíku 2 chromanového kruhu a 4',8' na fytylovém řetězci. Z toho tedy vyplývá $2^n=2^3=8$ možných stereoizomerů. Tokotrienoly mají pouze jedno chirální centrum na C2 chromanového kruhu. Syntetický vitamin E je směsí všech stereoizomerů v různém poměru.

Vitamin E je žlutá až žlutohnědá olejovitá kapalina. K dostání je jako běžná surovina v různých čistotách pro farmaceutický, potravinářský a kosmetický průmysl. Čistý je bezbarvý a bez zápachu [20]. Je destilovatelný za nízkého tlaku, dobře rozpustný v tucích a lipofilních rozpouštědlech, etheru, petroletheru, chloroformu, hexanu, méně v alkoholu a acetonu, a nerozpustný ve vodě. Při teplotě pod 40 °C jsou tokoferoly stabilní vůči silným alkáliím, za vyšších teplot se rozkládají. Estery tokoferolů se zmýdelňují v inertní atmosféře. V kyselém prostředí jsou tokoferoly stabilní a nerozkládají se ani při teplotě 100 °C s koncentrovanými minerálními kyselinami. Jsou citlivé vůči vzdušnému kyslíku, rozkládají se UV-světlem, mají silné redukční vlastnosti a snadno se oxidují. Stabilnější proti oxidaci jsou ve formě esterů, a náchylnost k oxidaci klesá s počtem methylových skupin [21].

Tokoly absorbují světlo o vlnové délce v UV oblasti. Absorpční maximum mají 292-298 nm. Estery absorbují méně. Přírodní vitamin E vykazuje přirozenou fluorescenci, excitace při 205-295 nm s maximální emisí při 330 nm, a je možné ho elektrochemicky oxidovat. Fluorescenci a možnost elektrochemické oxidace ale postrádá racemický vitamin E, který má blokovanou fenolickou hydroxylovou skupinu na chromanovém jádře [11].

5.6 Metody stanovení vitamínu E

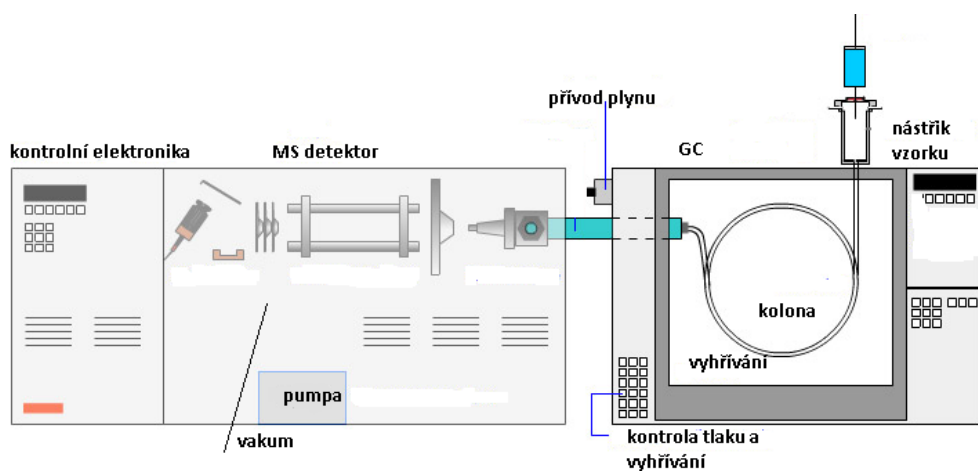
5.6.1 Chromatografie

Chromatografické metody se řadí mezi fyzikálně-chemické separační metody, založené na rozdílné afinitě dělených látek ke stacionární (nepohyblivé) a mobilní fázi. Chromatografické metody patří k nejdůležitějším metodám, které umožňují analyzovat složité směsi biologických molekul nebo vybrané složky směsi izolovat (preparativní provedení). Lze je rozdělit podle několika kritérií [22]:

- 1) povaha mobilní fáze: plynná (GC), kapalná (LC)
- 2) způsob provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- 3) princip separace: rozdělovací, adsorpční, iontově výměnná, gelová, afinitní
- 4) pracovní způsob: eluční (analytická ch.), frontální, vytěšňovací
- 5) účel: analytická, preparativní [22]

5.6.1.1 Plynová chromatografie (GC)

V plynové chromatografii je mobilní fází hnací plyn a stacionární fází pevná látka nebo kapalina vázaná na pevnou fázi. GC je možné dělit a analyzovat plyny a páry. Látka musí být v plynné fázi, nebo musí být jednoduše zplyněna bez rozkladu. Základní součásti plynového chromatografu jsou zdroj nosného plynu, čistící zařízení, nástřiková hlava, chromatografická kolona, detektor, zesilovač a počítač.

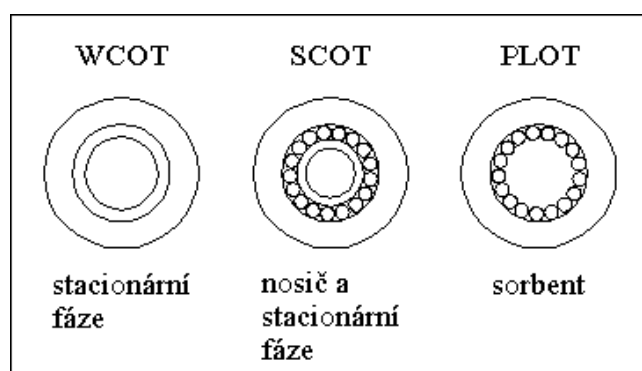


Obrázek 6: Schéma plynového chromatografu s hmotnostní detekcí [36].

Nosným plynem může být He, H₂, Ar nebo N₂ a volí se podle použitého detektoru. Dodávány jsou komerčně v tlakových lahvích s redukčním uzávěrem. Následuje čistící zařízení, které zachytí případnou vlhkost a stopy reaktivního kyslíku v nosném plynu. Regulační systém udržuje stálý nebo programově měnitelný průtok a teplotu. Dávkovač slouží k zavedení vzorku do proudu nosného plynu. Roztoky a plynné směsi dávkuje injekčními stříkačkami přes pryžové septum. K dávkování roztoku a plynné směsi slouží autosampler-automatizovaný nástřik vzorku, který umožňuje sériové analýzy, zrychlení práce a eliminaci nepřesností způsobených lidským faktorem. Kolona je trubice z nerezové oceli nebo skla naplněná zrnitým adsorbentem (GSC) nebo stacionární fází na inertním nosiči (GLC) [22].

Dle průměru a délky se dělí na náplňové analytické (vnitřní průměr 1 – 6 mm a délku 0,5 – 5 m, a na preparativní s vnitřním průměrem 8 – 100 mm a délkou 2 – 6 m).

Kapilární kolony jsou tenké kapiláry, stočené do šroubovice, zhotovené z nerezové oceli, skla nebo tvárného křemene. Vnitřní stěny kapiláry jsou povlečeny stacionární fází (vnitřní průměr je 0,1 – 0,5 mm a délka 10 – 100 m). Adsorbentem může být silikagel, aktivní uhlí, molekulová síta (hlinítokřemičitany), porézní polymery. Kapalnou stacionární fází jsou např. polysiloxany, polyestery (polyethylenglykoladipáty, polypropylenglykoladipáty, polyethylenglykolsukcináty), carbowaxy (polyethylenglykoly), ucony (polypropylenglykoly) [22,23].



Obrázek 7: Průřezy kapilárních kolon [22].

WCOT wall coated open tubular (potažené kapalnou polymerní fází)

SCOT support coated open tubular (na nosiči vázaná kapalná polymerní fáze)

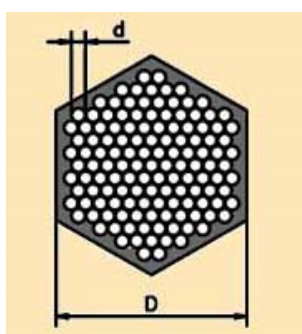
PLOT porous layer open tubular (s chemicky vázanou pevnou stacionární fází)

Multikapilární kolony jsou složeny z 919 až 1261 souběžných kapilár umístěných v jedné skleněné nebo nerezové kolonce. Rozlišují se stočené- pro zachování geometrie je multikapilára stočena jako běžná kolona a na koncích navazuje standardní deaktivovaná kapilára, a rovné, které se od sebe liší technickými parametry. Výhodou je stejná účinnost při zachování rychlosti analýzy (průtoky variabilní 20-210 ml/min) [26].

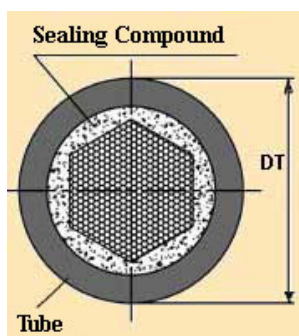
Tabulka 6: porovnání druhů kapilárních kolon [26].

Kolona	počet pater na 1m	počet pater na celou kolonu
Náplňová	1316	2632
Multikapilární	13664	13664
Kapilární	3774	113220

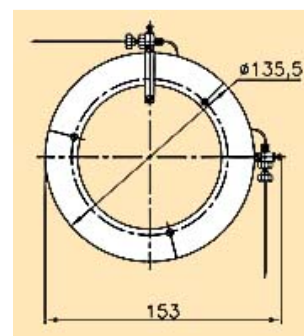
Kapacitu má největší kolona náplňová, následuje multikapilární a poté kapilární. Rozlišovací schopnost ovšem roste s počtem teoretických pater: kapilární > multikapilární > náplňová. Takže multikapilární kolona může být volbou pro rychlé screeningové analýzy jako náhrada náplňových [26].



Průřez multikapiláry



Multikapilární kolona
umístěná v ocelové trubce



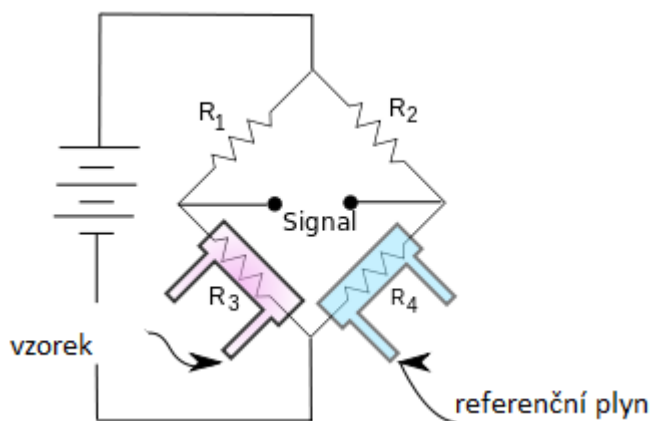
Multikapilární kolona
balená spirálovitě do kazety

Obrázek 8: Multikapilární kolona [27].

Detektory v GC

Tepelně-vodivostní

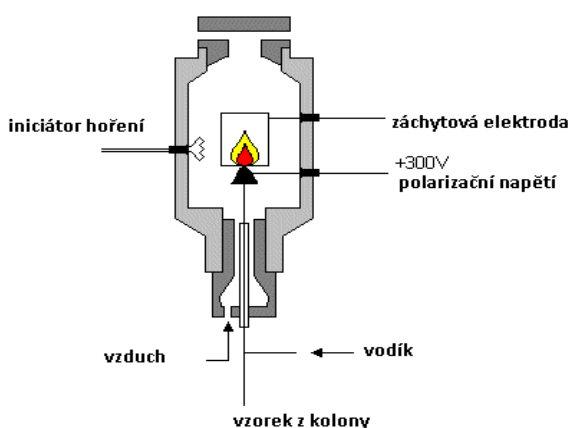
detektor se řadí mezi nedestruktivní. Sleduje se změna vodivosti čistého nosného plynu a nosného plynu s příměsí separovaných analytů vycházejících z kolony. Používá se jako čtyř nebo dvou vláknový, kdy se zároveň sleduje analyt a referenční proud plynu, nebo jednovláknový přepínací [28,30].



Obrázek 9: TCD=katharometr [29]

Plamenově-ionizační (FID)

je detektor destruktivního typu. Organické látky jsou po separaci spalovány ve vodíkovém plameni, tím dojde ke štěpení na radikálové nebo iontové fragmenty. Tyto částice se nabijí na první elektrodě a putují k druhé, kde svůj náboj odevzdávají. Takto vznikne ionizační proud mezi elektrodami, který je přímo úměrný počtu iontů. Odezva detektoru je závislá na počtu C v molekule, charakteru C-C vazeb a na počtu ostatních vázaných atomů. Použití pro kvantitativní analýzu. Mez detekce 10^{-12} g/ml [30,31].



Obrázek 10: Plamenově-ionizační detektor [31]

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda separace iontů produkovaných v iontovém zdroji přístroje na základě jejich efektivní hmotnosti (m/z , kde m -hmotnost iontu a z -nábojové číslo) a jejich následná detekce. Všechny tyto

procesy probíhají v uzavřeném prostoru, ve kterém je pomocí systému pump kontinuálně udržováno vakuum [33].

Přístroj je složen z těchto částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor, detektor, počítačová jednotka. Tento druh analyzátoru je vhodný pro biologické vzorky. Je s výhodou používán pro kvalitativní i kvantitativní analýzu zároveň. Mez detekce je na úrovni stopové analýzy (10^{-13} g/ml).

Iontové zdroje:

- ionizace elektronovým paprskem (EI)
- chemická ionizace (CI)
- ionizace rychlými atomy a ionty (FAB, fast atom bombardment)
- působením elektrostatického pole (FI-field ionisation, FD-field desorption)
- desorpce plasmou (PD)
- desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI-matrix-assisted laser desorption/ionization) / pevných částic (SALDI)
- ionizace elektrosprejem (ESI) / termosprejem (TSI)

Analyzátoři:

Kvadrupólový analyzátor je tvořený čtyřmi paralelními kovovými tyčemi uspořádanými symetricky vzhledem k trajektorii procházejících iontů, které jsou vzájemně elektricky propojeny, přičemž ionty produkované v iontovém zdroji jsou postupně propouštěny přes kvadrupól změnou velikosti napětí.

Ion-cyklotronová rezonance (ICR)- ionty se pohybují po uzavřených kruhových drahách, kde jsou vystavené homogennímu magnetickému poli.

Iontová past je funkční obdoba kvadrupólových analyzátorů s uzavřeným elektrostatickým polem.

Průletové analyzátoři (TOF)- ionty jsou z iontového zdroje akcelerovány napětím a stanovuje se doba průletu iontu letovou trubicí k detektoru).

Ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI)- vzorek je po smíchání s matricí vykrytalizován na destičce a následně je ozáren pulsním laserem, kdy dochází k ionizaci molekul matrice, a molekuly vzorku jsou ionizovány přenosem protonu z matrice. Matrice chrání vzorek před rozpadem, napomáhá odpaření a ionizaci vzorku. Měření probíhá buď v lineárním módu (přímá dráha letu, měření např. proteinů), anebo v reflektorovém módu (prodloužení dráhy letu za pomoci reflektorového iontového zrcadla) [34].

Detekce je umožněna buď v čase, nebo prostoru. Po detekci vzniká signál úměrný počtu dopadajících iontů a výsledkem je hmotnostní spektrum. Z tohoto záznamu vyčteme zastoupení jednotlivých iontů dle jejich m/z .

Výsledkem je chromatogram, záznam se soustavou píků. Na ose x lze odečíst retenční časy jednotlivých píků. Ten je charakteristický pro každou látku. Na ose y je intenzita, tedy lze odečíst z plochy nebo výšky píku koncentraci látky ve směsi.

Stanovení tokoferolů plynovou chromatografií v biologickém vzorku bylo poprvé popsáno v roce 1970 (Bieri J.G. et al.). Jednalo se o stanovení α -tokoferolu v erythrocytech. Lipidová membrána erythrocytů byla extrahována a přítomný α -tokoferol oxidoval na produkt α -tokoferolquinon. Následovalo dělení pomocí TLC, eluce skvrn a kvantifikace v systému GC. Podobně pokračoval v roce 1975 tým Kobayashi et al., který pomocí TLC a GC/MS oddělil a kvantifikoval α -, β -, γ -, δ -tokoferol a γ -tokotrienol v lidském mléce. V témže roce pro stanovení použil kolektiv Lin S.N. et al. otevřenou kapilární GC. V roce 1978 publikovala autorka J. Lehmannová metodu stanovení α -tokoferolu v lidské plasmě a krevních destičkách pomocí GLC, kdy stacionární fází byla kapalina Apiezon L. V následujících letech už se začínaly objevovat pro analýzu metody GC/MS (Osterlöf G. a Nyheim A., 1980; Thomas D.W. et al., 1981) i rychle se vyvíjející metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s fluorimetrickou, spektrofotometrickou nebo ELSD detekcí (De Leenheer A.D. et al., 1978; Leray C. et al., 1997).

5.6.1.2 Kapalinová chromatografie

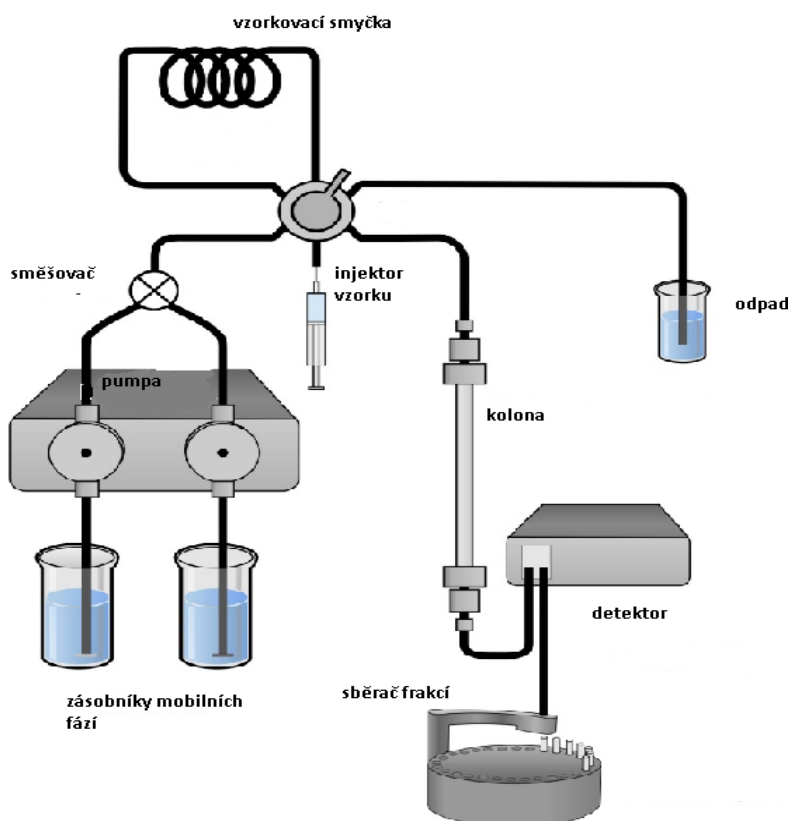
V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Uspořádání stacionární fáze je v koloně nebo na ploše.

Stacionární fází v koloně může být kapalina: kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC), gelová permeační chromatografie (GPC) nebo tuhá látka: kapalinová adsorpční chromatografie (LSC), iontově výměnná chromatografie (IEC).

V planárním (plošném) uspořádání je stacionární fází v papírové rozdělovací chromatografii (PC) a tenkovrstvé rozdělovací chromatografii (TLC) kapalina a u tenkovrstvé adsorpční chromatografie (TLC) pevná látka [22].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metoda založená na rozdílné distribuci analyzované složky mezi kapalnou mobilní fází a stacionární fází, které jsou vzájemně nemísitelné. Jde vlastně o vylepšenou formu sloupcové chromatografie, kdy hnací silou byla gravitace. V HPLC je mobilní fáze hnána přes kolonu tlakem. A tím je možné zkrátit čas analýzy. Další výhodou je možnost použití menších částic sorbentu, a tím zvýšit aktivní povrch pro interakci molekul analytu a stacionární fáze. To umožňuje lepší oddělení složek směsi. Metoda je rychlá, citlivá ale náročná na citlivost a rozlišovací schopnost detektorů. HPLC lze rychle (rutině) analyzovat i složité směsi látek s podobnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi, které by jinou metodou analyzovat nešly. Metoda je to kvalitativní i kvantitativní [35].



Obrázek 11: Kapalinový chromatograf. Hlavní části přístroje: zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, degaser, kolona, termostat, detektor a počítač se softwarovým vybavením [34].

Kvůli vysokému tlaku je celý přístroj konstruován z pevných inertních materiálů. Tlak klade nároky i na náplň a konstrukci kolony. Velkou roli hraje velikost a tvar částic (3-10 μm) a jejich nestlačitelnost. Běžně se tedy používá oxid křemičitý.

HPLC na normální fázi znamená, že stacionární fáze je polárnější než mobilní fáze. Oxid křemičitý je hydrofilní, mobilní fáze se pak používá hydrofobní.

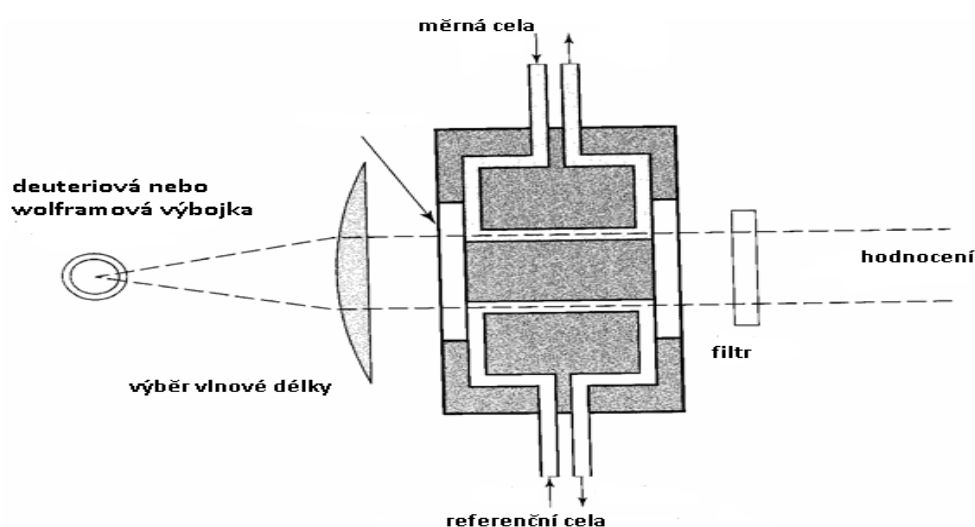
HPLC na reverzní fázi vzniká modifikací silikagelu. Hydrofobní povrch je tvořen dlouhými alkylovými řetězci spojených na oxid křemičitý. Ty zahrnují oktadecyl, oktyl, butyl (označené jako C18, C8, C4), a fenylové skupiny. Tady je hydrofobní (nepolární) stacionární fáze a mobilní fáze je polárnější. Jako mobilní fáze je možné použít vodu, methanol, acetonitril, pufrů a jejich směsi v různých poměrech. Tato metoda nyní převažuje v množství HPLC analýz a je nejčastěji používaná pro směsi látek nerozpustných ve vodě a biologické vzorky [34].

Důležitou součástí HPLC chromatografu je bezpulsní vysokoúčinná vakuová pumpa. Ta zajišťuje konstantní průtok MF nebo směsi MF za tlaku až 40 MPa. Tlak je nutný pro zajištění průtoku přes kolonu, protože částice silikagelu kladou mobilní fázi velký odpor, a samovolně by průtok téměř nebyl možný.

Detektory v HPLC systému

UV-VIS detekce

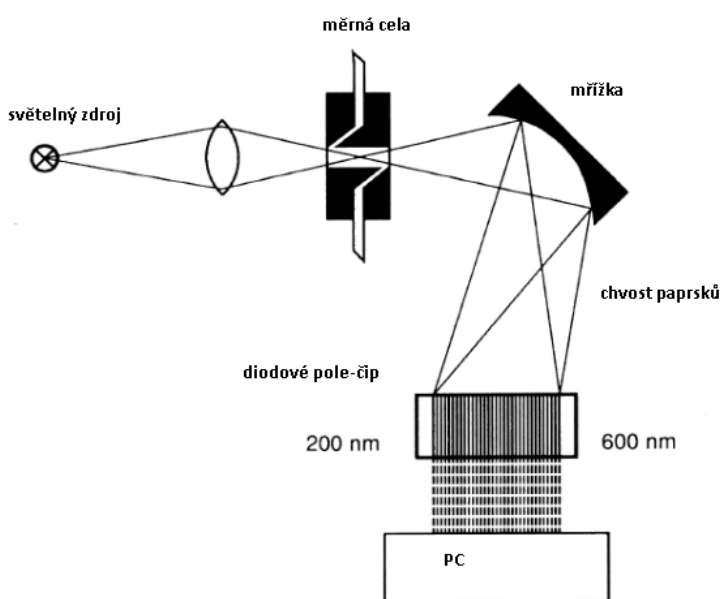
Detekce je založena na schopnosti některých látek absorbovat světlo v UV nebo viditelné oblasti spektra (tedy nad 200 nm). Pro měření musí látky splňovat alespoň jednu z vlastností: dvojnou vazbu sousedící s atomem nesoucím volný elektronový pár, brom, jod, síru, karbonylovou (C=O) nebo nitro skupinu (-NO₂), dvě konjugované vazby vedle sebe, aromatický kruh, nebo anorganické ionty. Míra absorpce je závislá na molekule jako celku a je pro různé sloučeniny odlišná. Vyjadřuje ji molární absorpční koeficient ϵ , který nalezneme v tabulkách. Konkrétní absorpce je dále závislá na velikosti měrné cely a koncentraci stanovované látky. Dnes se používají wolframové (produkce záření s vlnovou délkou 340-850 nm) a deuteriové lampy (200-340 nm). Pro pokrytí celého spektra UV-VIS se používají zároveň. Pomocí mřížky nebo zrcadla je vybrána vhodná vlnová délka, respektive úzké rozmezí okolo vlnové délky maxima absorpce. Tento detektor je nejčastěji využívaný, je citlivý, robustní, univerzální pro většinu látek [38].



Obrázek 13: Konstrukce UV-VIS detektoru [39]

UV detektor s diodovým polem

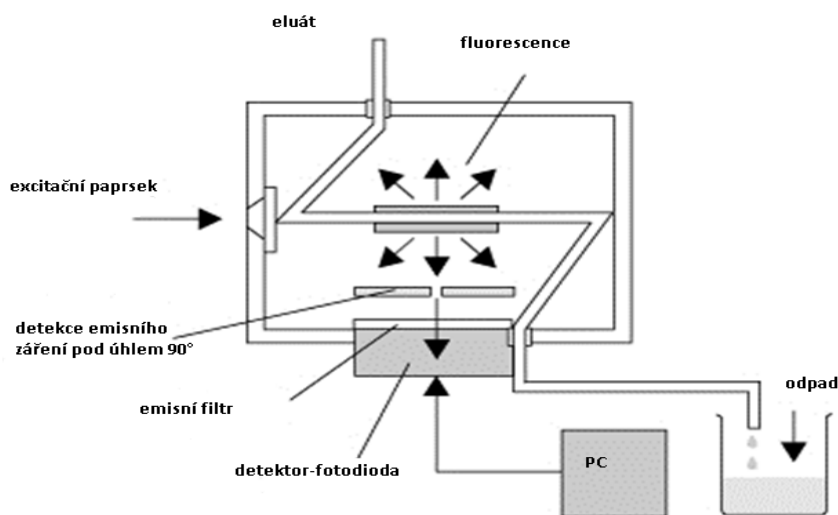
Oproti klasickým UV detektorům je založen na inverzní optice. Vzorkem v měrné cele prochází plné záření (bez výběru vlnové délky) a teprve za celou je mřížkou děleno na vlnové délky. Vzniká tak chvost paprsků, které dopadají na pole fotodiód umístěných těsně u sebe, z nichž každá detekuje určitý paprsek ze svazku o určité vlnové délce. Dle jemnosti rozlišení je jich v poli umístěno 512, nebo 1024. Celé spektrum je tak z čipu vyhodnoceno současně [38].



Obrázek 14: Detektor s diodovým polem [38]

Fluorescenční detektor

U látek schopných přirozené fluorescence nebo pre/postkolonovou derivatizací převedené na fluorescenční je možné detekovat fluorescenci o λ emisní, po předchozím ozáření světelným paprskem o vlnové délce λ excitační [38].



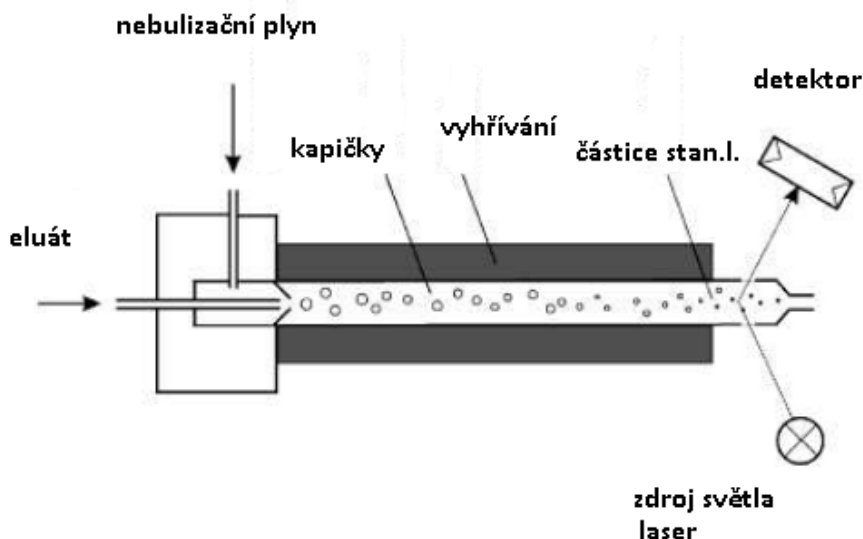
Obrázek 15: Fluorescenční detektor [39]

Chemiluminiscenční detektor

Chemiluminiscence je vyvolána chemickou reakcí. Pro analýzu tokoferolů je možné využít univerzální typ (další typ je specifický pro dusík a třetí pro síru). Vzhledem k tomu, že jejich princip je založen na reakcích v plynné fázi, je jejich rozšíření v oblasti plynové chromatografie daleko větší, než v oblasti chromatografie kapalinové. Konstrukčně jsou CL detektory velmi jednoduché, protože nepotřebují žádný zdroj záření a detekují pouze emitované záření [40].

Odpařovací detektor

ELSD-evaporative light scattering detector je univerzálně použitelný pro detekci netěkavých látek. Může být použit i při gradientové eluci a detekuje i látky bez chromoforů. Nevýhodou může být častá nelineárnost kalibračních křivek a MF musí být poměrně těžká oproti stanovované látce. Použité pufrý, např. kyselina mravenčí, octová a trifluoroctová musí být vysoké čistoty. Jako nebulizační plyn se používá dusík [38].



Obrázek 12: ELSD- eluát vycházející z kolony je rozprašován proudem inertního plynu v prostoru vyhřívané komory. Vznikají kapičky s malým množstvím MF, která je dále odpařována, a vznikají samostatné částice analytu. Procházející paprsek LED nebo polychromatického světla je osvětí a fotodioda nebo fotonásobič snímá změnu intenzity / rozptyl [38].

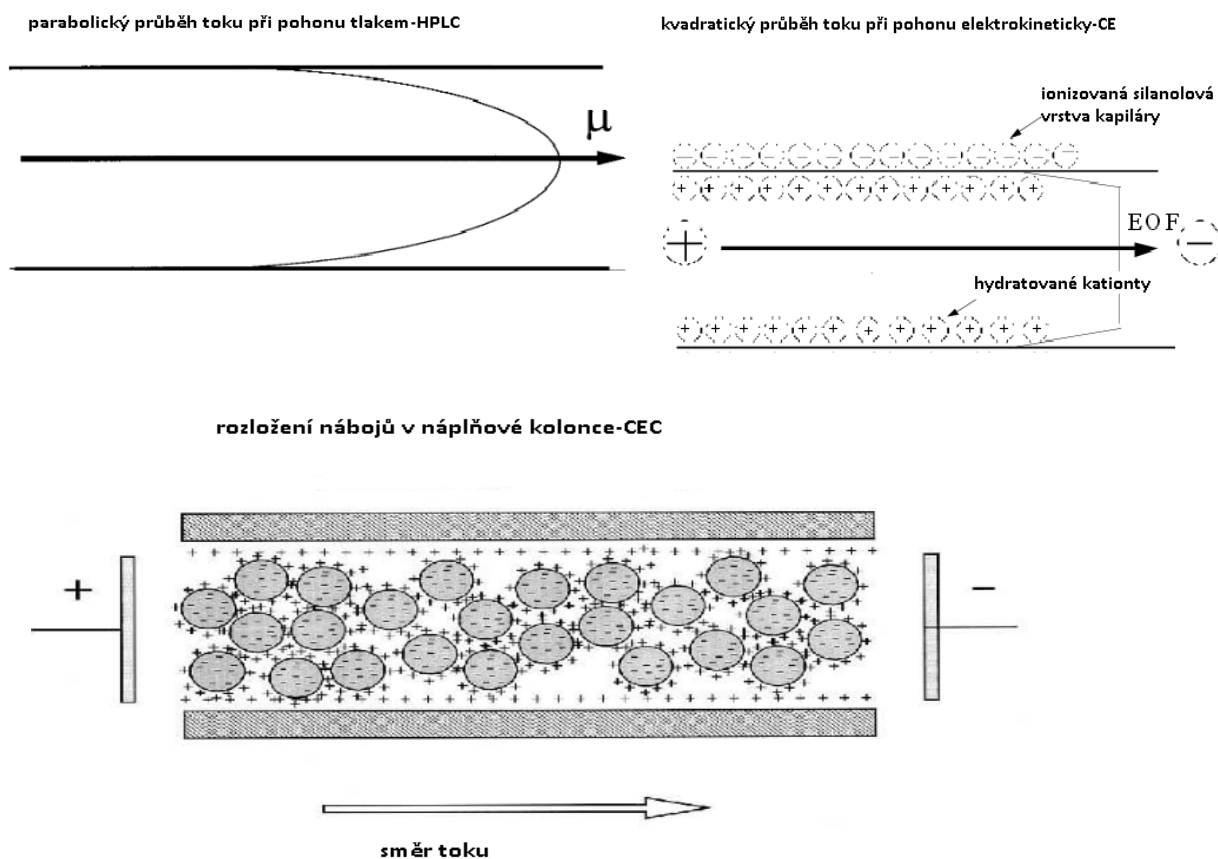
Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie-UHPLC

Ultra vysokoúčinná chromatografická metoda, která využívá v kolonách partikule s velikostí pod 2 μm , jež má za následek velmi vysoký zpětný tlak mobilní fáze (1000-3000 barů). Použitím stacionárních fází s velikostí částic pod 2 μm bylo dosaženo vyšší separační účinnosti. Negativním následkem je ale vyšší zpětný tlak, který vyžaduje speciální přístrojové vybavení. Šířka píků je při 10 minutové analýze mezi 1-2 s. Tím bylo dosaženo zvýšení analytické citlivosti tří-až pěti-násobně [41]. Při vysokém tlaku ale musí být brán ohled např. na určitou stlačitelnost mobilní fáze a termální efekty. Tyto jevy znesnadňují vývoj a optimalizaci metody v praxi [38].

5.6.2 Kapilární elektrochromatografie

Patří mezi tzv. hybridní metody, spojující vlastnosti kapalinové chromatografie a elektroosmózy. To znamená, že kapalná směs analyzovaných látek je hnána přes

kolonu pomocí potenciálového gradientu až okolo 50 kV/m místo hydraulického tlaku vakuové pumpy. Rychlostní profil není tedy parabolický, ale obdélníkový (Obrázek 16). Díky tomu nedochází k rozšiřování píků, není třeba používat kapiláry s co nejnižším průměrem, nemusí se brát v úvahu odpor proudění a délka kolony se volí dle konkrétních požadavků. Účinnost separace je stejná jako u GC, tedy vyšší než u HPLC. Mobilní fáze musí být ale vodivá. Jako mobilní fáze se používají pufrы o koncentraci 0,1 až 0,001 mol/l. Kapilára se během separace značně zahřívá a musí být účinně chlazena. [39]. Stejně jako u HPLC jsou kolony plněny různými fázemi, ale speciálním způsobem. Mezi pH 10 až 2 klesá téměř lineárně elektroosmotický tlak (EOF) a tím i významně rychlost analýzy. V analýze hydrofobních látek v biologických matricích je doporučeno používat nižší napětí (30 kV), kolonky s reverzní fází, mobilní fáze směsi methanol / acetonitril a „biologický pufr“ TRIS nebo CAPS. Tak se zamezí vzniku velkého množství Jouleova tepla v kapiláře a následné tvorbě bublin [42].



Obrázek 16: Toky kapaliny v HPLC, CE a CEC [42]

5.6.3 Spektrofotometrie

Je metoda stanovení koncentrace látek na základě jejich absorpce monochromatického světla. Absorpcí se sníží původní intenzita světla a podílem dekadického logaritmu původní hodnoty a snížené hodnoty získáme absorpenci A . Mezi absorpencí a koncentrací platí lineární vztah zvaný Lambert-Beerův.

Absorpční fotometrie slouží ke stanovení koncentrací jak bezbarvých, tak i barevných analytických disperzí. U bezbarvých roztoků se používá monochromatické světlo z UV oblasti (200-380 nm), u barevných roztoků se může použít jak UV, tak i viditelná oblast světla (380-760 nm). Rozhodujícím kritériem při volbě vlnové délky je co nejvyšší citlivost měření. To znamená nalezení takové vlnové délky, při které malé změně koncentrace odpovídá největší změna absorpance. Tomuto požadavku odpovídá vlnová délka absorpčního maxima; v případě většího počtu absorpčních maxim pak vlnová délka maxima s nejvyšší absorpencí [44].

5.6.4 Imunochemické metody

Imunochemické metody jsou založené na specifické vazbě antigenu a protilátky. Antigenem je v našem případě molekula vitamínu E, jenž je možné stanovit i přímo v původním biologickém vzorku.

5.6.4.1 ELISA

ELISA=enzyme linked immuno assay, je imunochemická metoda, při které je komplex antigen-protilátka vázán na pevný podklad (jamka polyethylenové destičky), a protilátka je značena enzymem. Enzym po přidání vhodného substrátu mění jeho barvu. Intenzitu změny barvy je možné kvantifikovat.

Ke značení se používají např. peroxidáza její substrát peroxid vodíku, který v přítomnosti chromogenu 1,2-diaminobenzenu dává žlutooranžový produkt, β -D-galaktosidaza a její substrát *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid, který je přeměňován na měřitelný žlutý nitrofenolový produkt, nebo alkalická fosfatáza a její substrát *p*-nitrofenylfosfát, který je přeměňován na nitrofenolát [45].

5.7 Úprava (biologického) vzorku

Ve většině případů je nutné uvolnit analyt z matrice (potravin, biologický materiál, krmiva...). Hrubé vzorky nebo tkáně je nutné rozvláknit nebo umlít. Následuje hydrolýza chemická - alkalická nebo kyselá, nebo enzymatická – proteázy, lipázy, arylsulfatáza, beta-glukuronidáza. Při uvolnění např. z krevních elementů je možné použít sonikaci (ultrazvuk) [46].

Následuje přečištění roztoku analytu, případně zakoncentrování, a odstranění balastních látek, které interferují při stanoveních. Dle stanovované látky pak vybíráme vhodnou metodu: vysolení, extrakce, popř. mikroextrakce, vysrážení, dialýza, superkritická fluidní extrakce, ultrafiltrace apod. [46].

Deproteinace

Slouží k izolaci nebo odstranění bílkovin z biologické matrice. Výhodou je možnost volby podmínek vhodných pro konkrétní vzorek. Nevýhodou je použití pro velký objem vzorku (ne stopová množství).

Tabulka 7: Přehled běžně používaných chemických precipitačních činidel [46]

Precipitant	pH supernatantu	Objem látky (ml) k precipitaci >95% proteinu v 0.5 ml plasmy	Poznámky
<i>Kyseliny</i>			
Kyselina trichloroctová (10%, w/v)	1.4–2.0	0.2	Použití při nízkých teplotách
Kyselina chloristá (6%, w/v)	<1.5	0.4	Použití při nízkých teplotách
Kyselina wolframová	2.2–3.9	0.6	Připravit vždy čerstvou
Kyselina metafosforečná (5%, w/v)	1.6–2.7	0.4	
<i>Inorganické sole</i>			
Síran měďnatý–wolframan sodný	5.7–7.3	1.0	Nevhodné pro analyty které tvoří komplexy s kovy
Hydroxid zinečnatý	6.5–7.5	1.5	
Síran amonný (nasycený)	7.0–7.7	2.0	Relativně neúčinné
<i>Organická rozpouštědla</i>			
Acetonitril	8.5–9.5	1.0	
Aceton	9–10	1.0	UV cut-off při 330 nm
Ethanol	9–10	1.5	
Methanol	8.5–9.5	1.5	

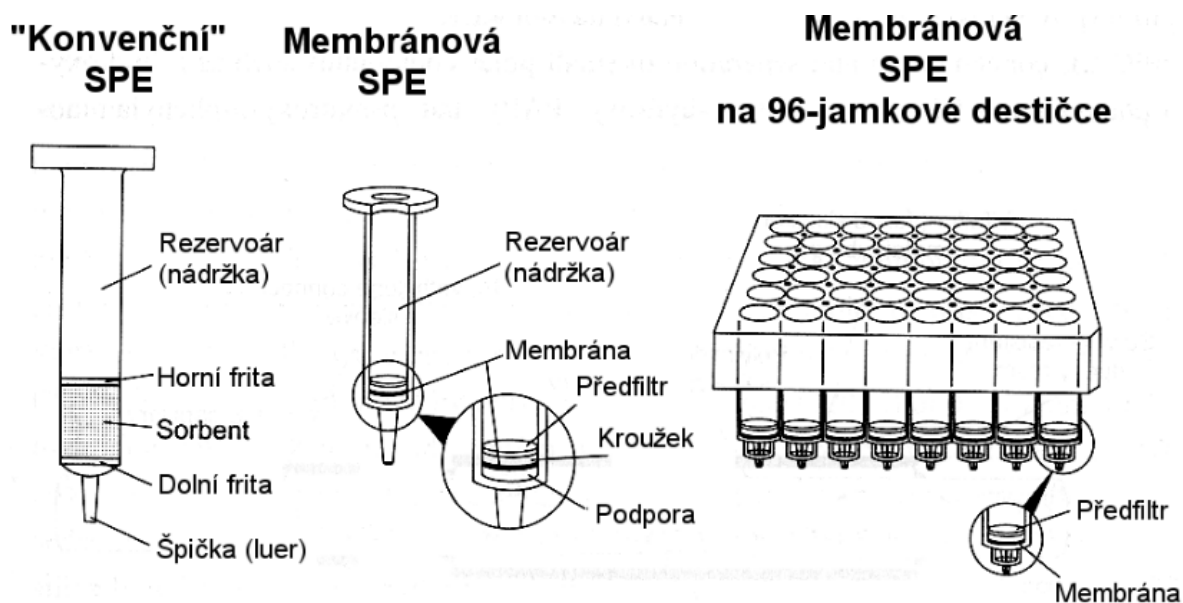
Ultrafiltrace

Je separační metoda založená na dělení makromolekul o velikosti přibližně 3 nm - 0,1 μm od roztoku na porézní přepážce. Hnací silou dělení je rozdíl tlaku na obou stranách přepážky. Metoda je vhodnější pro malé objemy vzorků. Výhody- máme možnost automatizace a volby mírných reakčních podmínek neovlivňujících nijak sledovaný analyt. Ultrafiltrace je zvláště výhodná u biologických matric jako přečišťující proces (po předchozí deproteinaci), pro zajištění ochrany chromatografické kolony před zanesením balastem. Nevýhodou je možnost částečné vazby analytu na membránu [46].

Extrakce na pevnou fázi (SPE)

Metoda založena na rovnovážné distribuci analytu mezi vodnou a tuhou fází, přičemž rovnováha je posunuta ve prospěch tuhé fáze.

Roztok analytu je přiveden do kontaktu s tuhým aktivovaným sorbentem, který sorbuje analyt a pouze v minimální míře ostatní složky vzorku. Zachycený analyt je následně uvolněn elucí vhodným elučním činidlem a analyticky stanoven [47].



Obrázek 17: SPE-různá uspořádání [48]. Pevná fáze je ve formě ohraničené vrstvy sorbentu nebo membrány. Sorbenty jsou umístěny v komerčně dodávaných kolonkách nebo mikrodestičkách.

Mikroextrakce na pevné fázi

Princip mikroextrakce je stejný jako u SPE, ale jedná se o miniaturizované provedení. Pevná fáze, na kterou se zachycuje analyt, je ve formě vlákna nebo patrony umístěné uvnitř jehly. Sorbent se do kontaktu s roztokem dostává buď vysunutím vlákna, nebo nasátím roztoku do stříkačky. Z roztoku analytu poté následuje sorbce, případně vymytí balastů. Z vlákna se analyt uvolní po přenesení do rozpouštědla nebo přímo do GC nebo HPLC systému [46].

Extrakce kapalina-kapalina

Využívá směsi dvou nemísitelných kapalin, nejčastěji vodný roztok a organické rozpouštědlo. Analyt přechází na základě lepší rozpustnosti z jednoho roztoku přes fázové rozhraní do druhého. Nevýhodou je použití velkého množství organických rozpouštědel, velkého objemu vzorku. Výhodou je jednoduchost, možnost miniaturizace, dostupnost a poměrně velká výtěžnost [46].

Materiály s omezeným přístupem (RAM)

Tyto materiály mají buď nespecifické dutiny, které umožňují zadržení analytů na základě jejich velikosti i specifické dutiny, které jsou velikostně, sféricky i funkčními skupinami navrženy pro jeden analyt. Kolony mohou být zapojeny místo analytické kolony přímo v GC nebo HPLC, kdy biologický materiál je přímo nastříknut do systému a všechny složky postupně odchází k detektoru. Nebo v uspořádání „přepínání“ kolon, kdy kolonka s RAM materiálem zadrží analyt, balast je odstraněn do odpadu, a zadržený analyt je selekčním ventilem poslán na analytickou kolonu a k detektoru. Výhodou je rychlost, lepší reprodukovatelnost, výtěžnost extrakce a menší spotřeba rozpouštědel [48].

Pre a post kolonová derivatizace

Analyt je před nebo po průchodu kolonou chemickou reakcí změněn na produkt s určitou vlastností, která je detekována vhodným detektorem. Mezi derivatizační reakce patří chemiluminiscenční, hydrolytické, enzymatické, redoxní, komplexotvorné a termálně iniciační reakce [46].

6. PRAKTICKÉ MOŽNOSTI STANOVENÍ

6.1 Stanovení vitamínu E chromatografickými metodami

Pro stanovení vitamínu E jsou v současnosti nejvíce využívanými metodami vysokoúčinná a ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV/PDA detekcí. Méně využívaná jsou stanovení pomocí GC a elektrochromatografie.

6.1.1 Současné stanovení vitamínu A a E v lidské plasmě pomocí přepínání kolon s on-line extrakcí [49]

Vzorek plasmy byl naředěn 1:1 směsí isobutanol/isopropanol 3:2 (v/v) a následně centrifugován. 50 µl supernatantu bylo dávkováno do systému. Jako vnitřní standard byl použit tokoferol acetát.

Při stanovení autoři použili polymerní předkolonu RAM LiChroCART (25 mm x 4 mm) plněnou LiChrospher RP-18 ADS. Mobilní promývací fáze byla zvolena směs methanol/voda v poměru 30:70 (v/v) s obsahem SDS (20 mM), průtok 1,3 ml/min. Přepnutí z RAM kolony na analytickou (monolitická kolona Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4,6 mm, Merck) proběhlo po 4 minutách od nástřiku. Analytická mobilní fáze obsahovala na počátku gradientové eluce rozpouštědla methanol/voda 90:10 (v/v) až po 100% methanol na konci. UV detekce analytů proběhla při 285nm. Celkový čas stanovení byl 15 minut. Výtěžnost pro vitamín E je 91,4 %, LOD (limit detekce) 0,84 µmol/l. Metoda poskytuje lepší výsledky a velkou úsporu času, nežli klasická úprava vzorku pomocí SPE.

6.1.2 Současné stanovení vitamínu A a E v lidském séru metodou HPLC [50]

K extrakci vitamínů ze séra byla použita směs n-hexan/dichlormethan 70:30 (v/v). Extrakce proběhla dvoustupňově. Organická vrstva byla odebrána, odpařena, znovu rozpuštěna ve směsi methanol/ethanol 5:95 (v/v). Na podporu stability vitamínu E proti oxidaci byl přidán BHT (butylovaný hydroxytoluen, E321). Na kolonu bylo dávkováno 20 μ l extraktu.

Autoři porovnávali účinnost několika kolon za různých průtoků: Kromasil 100 C18 (Sigma Aldrich, USA) (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m), Brownlee analytická kolona C18 (Perkin Elmer, USA) (150 mm x 4,6 mm, náplň 5 μ m, Supelcosil LC-18 (Supelco, USA) (15 mm x 3 mm, 3 μ m). Jako ochrana byla použita předkolona C18 (30 mm x 4,6 mm, 10 μ m, Norwalk, USA). Eluce byla provedena izokraticky mobilní fází ve složení methanol/voda 99:1 (v/v) a průtokem 1,5 ml/minutu a poté v novém měření 1 ml/minutu. Teplota na koloně byla 25°C.

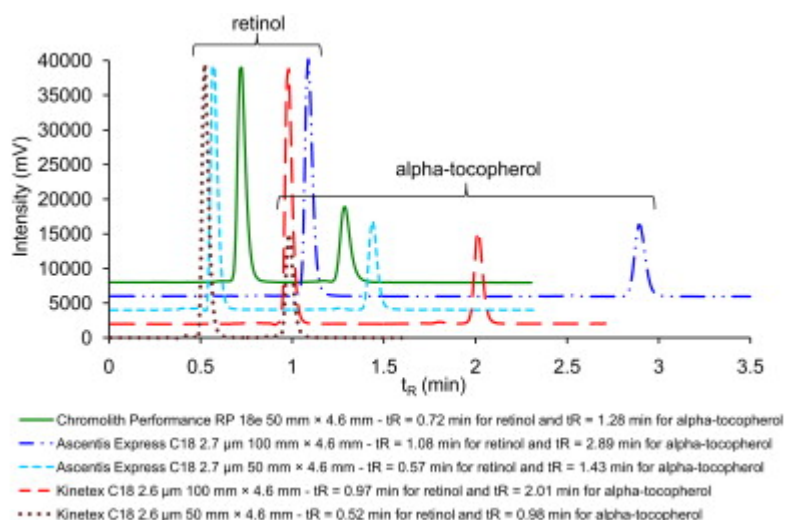
Dělení probíhalo ve 3. (vitamín A) respektive 6. minutě (vitamín E). Kolony s částicemi o velikosti 3 μ m ukázaly při dělení směsi vyšší separační účinnost než s velikostí 5 μ m.

6.1.3 Stanovení vitamínu A a α -tokoferolu v mateřském mléce pomocí core-shell technologie částic [51]

K porovnání bylo použito 5 různých kolon (Obrázek 18). Kolona Chromolith (Merck, Německo) je monolitní a je uvedena jako referenční. Kolony Kinetex (Phenomenex, USA) a Ascentis Express (Supelco, USA) obsahují částice s porézním povrchem ale, pevným jádrem (core-shell technologie). Pomocí této technologie je možné zvýšit rozlišení jednotlivých analytů a rychlost analýzy. Vzorek mléka byl zpracován deproteinací ethanolem, zmýdlením roztokem KOH a LLE n-hexanem. Odpařená organická vrstva se rozpustila v methanolu a byla použita pro nástřik. Detekce proběhla pomocí detektoru s diodovým polem při λ 325nm (vitamín A) a 295nm (vitamín E). Postup stanovení se shodoval u všech použitých kolon.

Jako nejlepší byla vybrána kolona Kinetex C18 (2,6 μ m, 100 mm x 4,6 mm). Použitím této kolony se docílilo snížení času analýzy na 1,75 min oproti ref. metodě s časem 1,8

minuty a ke snížení objemu činidel o 263 ml na 100 analýz. Validační data nové metody (1- vit. A, 2- vit.E): limity detekce (LOD) byly stanoveny na 0,004 $\mu\text{mol/l}$ a 0,078 $\mu\text{mol/l}$, limity kvantifikace (LOQ) 0,012 $\mu\text{mol/l}$ a 0,182 $\mu\text{mol/l}$, výtěžnost (recovery) se pohybovala v rozmezí 114,1-116,3 % a 99,0-108,6 %.



Obrázek 18: Porovnání chromatogramů stanovení retinolu a alfa-tokoferolu pěti různými kolonami [51]

6.1.4 Stanovení vitamínu E v mateřském mléce s/bez předchozího zmýdelnění pomocí HPLC-UV [52]

Mateřské mléko bylo sbíráno od 18 dobrovolnic a zmraženo na -20°C . Před úpravou vzorku bylo zahřáto na 38°C a homogenizováno sonikací.

K reprezentativnímu vzorku mléka byl přidán methanol, pyrogallol a KOH. Zmýdelnění probíhalo 30 minut při 70°C . Po ochlazení bylo upraveno pH na 2 pomocí HCl. Extrakce proběhla chlazeným hexanem. Organická vrstva byla odpařena pod mírným proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve směsi methanol-propan-2-ol (1:1).

Do druhého vzorku nebyl přidán hydroxid draselný a kyselina chlorovodíková. Dále byl postup shodný. Nástřík vzorku byl 25 μl extraktu a jako standard byl zvolen přídavek δ -tokoferolu.

Oba vzorky byly analyzovány pomocí HPLC s detektorem diodového pole. Pro separaci byla použita předkolona Symmetry C18 (10 mm x 3,9 mm) a analytická kolona C18 Symmetry (Waters, USA) (150 mm x 3,9 mm). Gradientová eluce probíhala 10 minut směsí acetonitril/voda 95:5, a 10 minut 100 % acetonitrilem. Průtok MF byl nastaven na 1 ml/minutu, teplota 45°C. Vlnová délka měření se pohybovala v rozmezí 275-350 nm.

Oby typy extrakcí mohou být použity pro měření. Extrakce se zmýdelněním prodloužila sice analýzu o 30 minut, ale poskytla výtěžnost 99,8 % oproti extrakci bez zmýdelnění (60 %). Jako vnitřní standard byl zvolen δ -tokoferol.

6.1.5 Analýza tokoferolů a tokotrienolů včetně jejich metabolitů v různých myších a lidských biologických materiálech [53]

Jako biologické vzorky byla použita moč, fekální vzorky, sérum a tkáně (tlusté střevo).

Moč a následně i sérum bylo smícháno s roztokem 1 % aq kyseliny askorbové a ethanolem. Fekální vzorky byly homogenizovány, tkáně byly mechanicky rozrušeny a poté byl postup shodný jako v případě séra a moči. Extrakce proběhla dvoustupňově hexanem. Organická fáze byla odpařena a rozpuštěna ethanolem. Tímto krokem přešly do extraktu tokoferoly, tokotrienoly a metabolity s dlouhým řetězcem.

Vzorek tkáně byl ještě dále podroben enzymatickému štěpení sulfatázou a β -glukuronidázou po dobu 90minut. Směs byla pufrována fosforečnanem sodným. Extrakce proběhla opět dvoufázově v 1ml ethylacetátu. Odparek byl rozpuštěn 40%ethanolem. Tímto krokem došlo k uvolnění metabolitů se středně dlouhým a krátkým řetězcem. Extrakt tkáně z 1. a 2. kroku byl smíchán.

Analýza proběhla pomocí 2 analytických systémů.

1) Vysokoúčinné kapalinové chromatografie s coulometrickou detekcí. Jako stacionární fáze byla použita kolona s reverzní fází Supelcosil C18 RP (Supelco, USA) (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m). Mobilní fáze byla tvořena roztokem A (acetonitril/ethanol/voda, 165: 135: 700, v: v: v, obsahující 20 mmol / l octanu amonného, pH: 4,4) a roztokem B (acetonitril/ethanol/voda, 539: 441: 20, v: v: v, obsahující 20 mmol / l octanu

amonného, pH: 4,4). Gradientová eluce započala lineárním zvýšením B 18-77 % po dobu 8 minut, při průtokové rychlosti 0,6 ml / min, následovalo udržování B na 77 %, 8-16 minut. Poté byl B změněn z 77 % na 100 %, od 16. minuty do 35. minuty při rychlosti průtoku 0,8 ml / min. Od 35,1 minuty byl průtok zvýšen na 1,1 ml / min až do 50. minuty. 50,1 min, B byl vrácen na 18 %, při průtokové rychlosti 1 ml / min po dobu 10 minut. Eluent byl monitorován pomocí detektoru CEAS (elektrochemický detektor s diodovým polem) s nastavením potenciálů na 200, 400, 500, a 700 mV.

Metoda byla validována: linearita (10 nmol / l - 200 μmol / l), limity detekce 0,05 pmol a meze kvantifikace 0,2 pmol pro tokoferoly. Výtěžnost extrakce byla více než 90 %.

2) Kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (ionizace elektrosprejem a detekce iontovou pastí). Chromatografická kolona byla shodná s 1). Mobilní fáze byla také shodná s 1) pouze bez octanu amonného. Gradientová eluce byla zvolena takto: B byla zvyšována lineárně mezi 0-15. minutou z 35 % na 100 %, 15,1-42 minutu byla udržována na 100 % B. MS detekce proběhla v negativním módu.

Byla stanovena linearita (20 nmol / l - 200 μmol / l), limit detekce 1 pmol a mez kvantifikace 4 pmol pro tokoferoly.

Úprava vzorků a následná analýza myších a lidských vzorků se podobala, uvedla jsem jen podrobnosti týkající se lidských vzorků. V původní autorské práci jsou k nahlédnutí chromatogramy z analýzy séra, moči, fekálií a jater jak myší tak lidské, bez užívání doplňků stravy obsahující vitamín E i po vzorkování v časových úsecích po podání. Z výsledků je jasné, že hlavní cesta vylučování vitamínu z těla jsou fekálie.

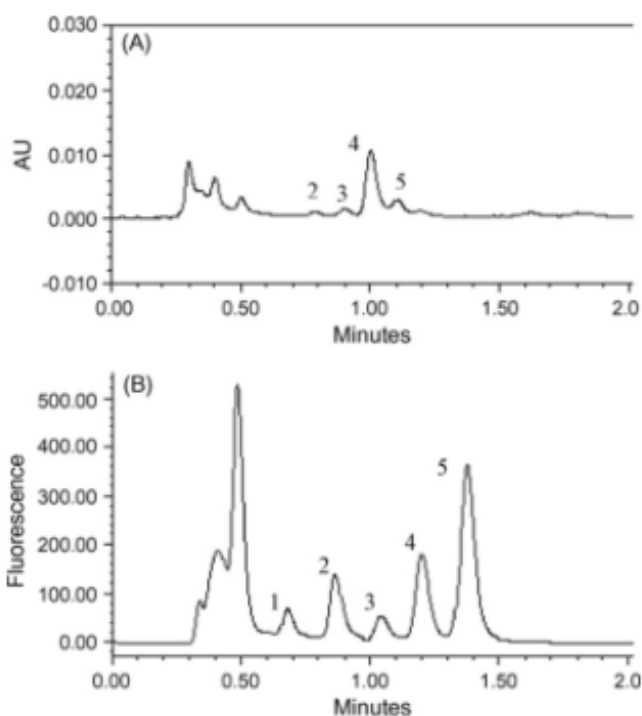
6.1.6 Analýza mleziva a mateřského mléka metodou UHPLC [54]

Značná část práce byla věnována optimalizaci přípravy vzorku, tak aby byla univerzální pro oba zvolené analytické systémy popsané dále. Autorka vyzkoušela deproteinaci ethanolom a acetonitrilem v chladu. Oba přístupy měly stejný efekt, pro práci zvolila chladný ethanol. Dále se zabývala vhodným poměrem mléko:ethanol:n-hexan. Zvolila poměr 1:2:3 (v/v/v), protože výsledná organická vrstva se díky většímu objemu dá odebrat velmi dobře ručně, což je výhodné při zpracování velkého množství vzorků. Výsledek extrakce byl stejný, jako v literatuře dříve publikované. Dále zjistila, že na

výtěžnost extrakce nemá velký vliv provedení extrakce jedním podílem nebo dvojnásobně. Optimální množství vzorků mléka z hlediska citlivosti detekce bylo stanoveno na 300 μ l. Organická vrstva byla přefiltrována přes filtr s velikostí pórů 0,22 μ m (odstranění případných sraženin balastu). Do systému UHPLC byly nastříknuty 3 μ l extraktu.

Pro analýzu byl použit UPLC systém (Waters, USA) vybaven chlazeným autosamplerem, dvěma zásobníky MF, termostatem a detektorem 2475 multi fluorescenčním a diodovým polem (2996 PDA). Mobilní fází byla zvolena směs acetonitril/methanol 60:40 (v/v), izokraticky, průtok 0,6 ml/minutu. Jako předkolona byla použita Acquity Van Guard Pre-column (5 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m). Separace probíhala na koloně Acquity (Waters, USA) UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m). Vitamin E byl detekován detektorem s diodovým polem. Čas analýzy byl pouze 1,6 minuty.

Pro porovnání byla zvolena druhá kolona- Zorbax Eclipse plus C18 Rapid Resolution High Throughput (Agilent Technologies, USA) (50 mm x 2,1 mm, částce 1,8 μ m) kombinovaná s fluorescenční detekcí.

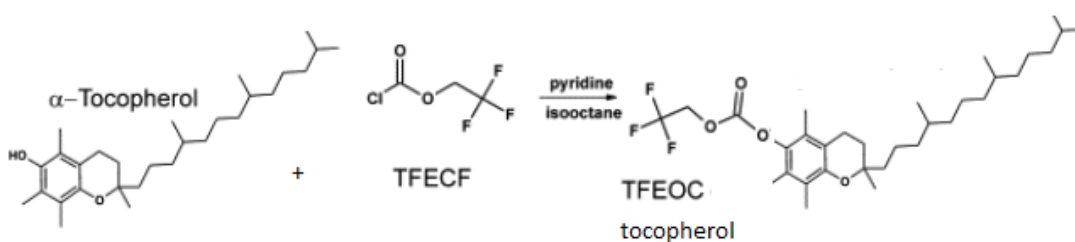


Obrázek 19: Reprezentativní chromatogram vzorku mléka 1)tokol-vnitřní standard 2)δ-tokoferol, 3)γ+β-tokoferoly, 4)α-tokoferol a 5)tokoferol acetát, A)kolona Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, částice 1,7 μm), PDA (λ=292nm), B) Zorbax Eclipse plus C18 (50 mm x 2,1 mm, částice 1,8 μm), FD (λ_{ex}=297 nm, λ_{em}=328 nm) [54]

Oba přístupy byly nezávisle validovány a shledány přesnými a citlivými pro stanovení α-, β+γ, δ-tokoferolů v mléce. Jako vnitřní standard byl v případě FD zvolen tocol, a α-tokoferol acetát u PDA. Validační data jsou přehledně uvedena v autorské publikaci.

6.1.7 Stanovení vitamínu E metodou GC po derivatizaci v séru a plodové vodě [55]

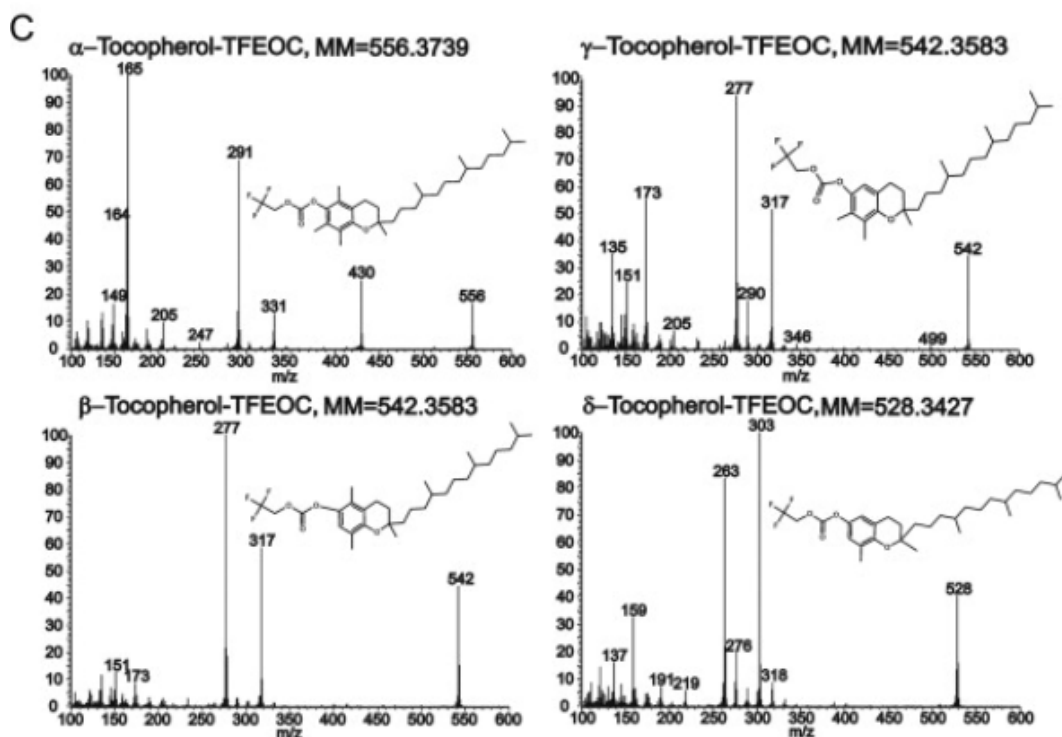
Úprava vzorků séra a plodové vody spočívala v reakci sekundární hydroxylové skupiny na tokoferolech a derivatizačního činidla ze skupiny alkylchlorformiátů (Obrázek 20). Výsledné produkty se tím staly těkavějšími a vhodnými pro aplikaci do GC systému.



Obrázek 20: Derivatizační reakce: reaguje α-tokoferol s alkyl-chlorformiátem trifluorethyl-chlorformiátem za katalýzy pyridinu v prostředí isooktanu [55].

Derivatizace proběhla v prostředí isooktanu a zároveň probíhala extrakce kapalina-kapalina pomocí acetonitrilu. Vzorky séra i plodové vody byly před reakcí zmýdelněny roztokem KOH a extrahovány n-hexanem.

Studie byla provedena na chromatografu od firmy Thermo Fisher Scientific (USA), Trace GC Ultra, kolona byla kapilární DB1-HT (15 m x 0,25 mm, film 0,1 μm) a detekce probíhala na kvadrupólovém analyzátoru s elektronovou ionizací. Mobilní fáze byla hélium s průtokem 1,1 ml/minutu.



Obrázek 21: Hmotnostní spektra tokoferolů (elektronová ionizace) [55]

Pro kvantifikaci a ověření bylo vybráno několik fragmentů molekulárních iontů (režim SIM). Metoda byla validována. Důležité analytické hodnoty vztahující se ke stanovení tokoferolů jsou uvedeny v Tabulce 8.

Tabulka 8: Hodnoty retenčních časů, rozmezí kvantifikace, regrese a nejnižší bod kvantifikace tokoferolů v séru a plodové vodě [55]

Analyte-TFEOC der.	RT (min)	Range of quantification (µg/ml)	Regression line serum	R2 serum	LLOQ ^b (µg/ml)
5-α-Cholestane	3.69	5	Internal standard (I.S.)		
δ-Tocopherol	4.01	0.15–30	0.0075x – 0.0008	0.9907	0.15
β-Tocopherol	4.15	0.15–30	0.0163x – 0.0022	0.9986	0.15
γ-Tocopherol	4.20	0.15–30	0.0220x + 0.0113	0.9531	0.15
α-Tocopherol	4.32	0.15–30	0.0141x – 0.0030	0.9796	0.15

6.1.8 Stanovení tokoferolů, tokotrienolů a jejich metabolitů metodou HPLC-MS na normální fázi [56]

Biologickým materiálem byla zvolena lidská plasma, která byla ředěna destilovanou vodou, a společně s přidavkem tocopherol acetátu, jako vnitřního standardu, byla podrobena dvojnásobné extrakci do kapaliny. Proti oxidaci byl přidán tributylhydroxytoluen. Odparek z extrakce byl rozpuštěn ve směsi n-hexan/1,4-dioxan 99,9:0,1 (v/v). Pro nástřik bylo odebráno 50 μ l.

HPLC systém byl použit od společnosti Waters (USA) doplněný analytickou kolonou s normální fází propyl-amin (250 mm x 2 mm, 3 μ m). Eluce byla gradientová za použití mobilních fází: A) n-hexan a B) n-hexan/1,4-dioxan 1:1 (v/v). Ionty byly sledovány v pozitivním módu po ionizaci za atmosferického tlaku (APCI) viz Tabulka 9.

Tímto postupem bylo dosaženo nízkých mezí detekce a stanovitelnosti, vysoké přesnosti a výtěžnosti (Tabulka 10). Metoda byla validována pro skrining a kvantifikaci jednotlivých složek vitamínu E a jeho metabolitů v lidské plasmě. Rozlišovací schopnost metody navíc umožnila oddělení a kvantifikaci jinými metodami většinou neoddělitelnou frakci β a γ tokoferolů.

Tabulka 9: Seznam tokoferolů, tokotrienolů a jejich metabolitů stanovovaných v matrici, Q1-sledované molekulární ionty, Q3-fragmentovaný iont, a charakteristické neutrální ztráty hmotnosti v pozitivním módu APCI [56]

analyte	MW [Da]	Q1 m/z	Q3 m/z	characteristic mass loss [Da]
$^2\text{H}_8$ - α -tocopherolacetate	481	482	216	266
α -tocopherolacetate	472	473	207	266
$^2\text{H}_8$ - α -tocopherol	439	440	174	266
α -tocopherylquinone	446	429	165	264
$^2\text{H}_8$ - α -tocopherol	436	437	171	266
α -tocopherol	430	431	165	266
α -tocotrienol	424	425	165	260
β -tocopherol	416	417	151	266
γ -tocopherol	416	417	151	266
β -tocotrienol	410	411	151	260
γ -tocotrienol	410	411	151	260
δ -tocopherol	402	403	137	266
δ -tocotrienol	396	397	137	260

Tabulka 10: Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, výtěžnost a správnost pro jednotlivé analyty [56]

analyte	lower limit of detection [nmol /L plasma]	lower limit of quantitation [nmol /L plasma]	linear range [μmol /L plasma]	linearity coefficient (R^2)	recovery [%]	accuracy [%]
α-tocopherylacetate	3	8	0.01–2.5	0.9977	92	103
² H ₈ -α-tocopherol	14	46	0.06–14	0.9960	92	103
α-tocotrienol	28	94	0.09–28	0.9989	69	101
α-tocopherylquinone	9	31	0.04–9	0.9988	87	na
β-tocopherol	29	96	0.5–29	0.9923	64	na
γ-tocopherol	29	96	1.6–11	0.9778	53	na
β-tocotrienol	39	130	0.14–29	0.9884	63	na
γ-tocotrienol	39	130	0.12–29	0.9930	69	na
δ-tocopherol	30	99	0.18–10	0.9939	58	na
δ-tocotrienol	51	168	0.17–10	0.9919	63	99

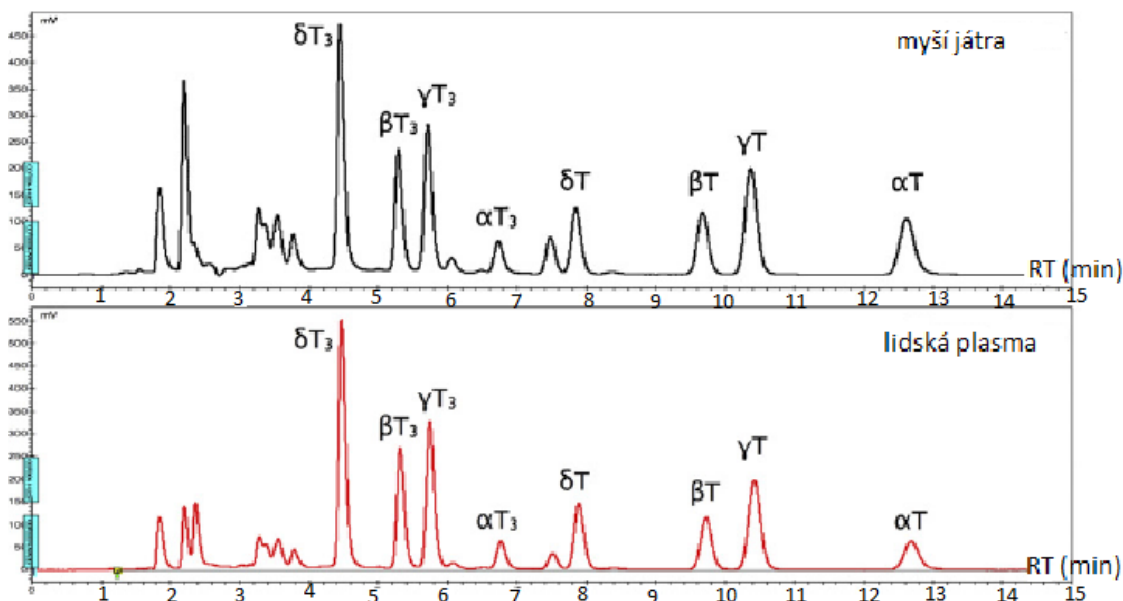
6.1.9 Separace a kvantifikace všech izoform tokoferolů a tokotrienolů v myších játrech a lidské plasmě metodou HPLC na reverzní fázi[57]

Studie zabývající se vlivem vitamínu E na lidské zdraví byly limitovány omezeným analytickým stanovením všech složek vitamínu E v biologických matricích. Proto byla vyvinuta a validována metoda kapalinové chromatografie s použitím stacionární reverzní fáze Kinetex PFP (Phenomenex, USA) (2,6 μm, 150 × 4,6 mm) a mobilní fáze sestávající ze směsi methanol:voda (85:15, v/v) a průtokovou rychlostí 0,8 ml/min.

Stacionární fáze kolony je na bázi pentafluorophenylu (core-solid). Použitím této fáze bylo dosaženo rozdělení a kvantifikace všech osmi složek vitamínu E. Analýza trvala 15 minut. Tlak, vyvíjený v systému, byl 23 MPa a lze ho akceptovat u většiny dostupných HPLC systémů. Metoda je rychlá, lineární a přesná, s výtěžností extrakce 82-122 % a detekčními limity 27-156 pg.

Biologickým materiálem pro analýzu byly použity vzorky myších jater a lidské plasmy. Extrakce vitamínu E z jaterní tkáně proběhla 2x n-hexanem, po předchozí deproteinaci ethanolem a zmýdelnění hydroxidem draselným. Úprava vzorků plasmy proběhla obdobně, ale bez zmýdelnění. Odparek hexanového extraktu byl resuspendován ve směsi methanol:voda (85:15, v/v), a 10 μl bylo nastříknuto do systému HPLC. Detekce fluorescence analytů proběhla při excitační vlnové délce 296 nm a emisní vlnové délce

325 nm. Metoda je univerzální, lze ji použít i s jinými detektory a pro jiné biologické i potravinářské vzorky (ořechy, amarant) s malými úpravami vzorků před nástřikem.



Obrázek 22: Reprezentativní chromatogram vzorků myších jater a lidské plazmy [57]

6.2 Spojení imunochemické přípravy vzorku s HPLC analýzou

6.2.1 Vitamin A and Vitamin E HPLC Assay [58]

Set (Alpco, USA) je určen pro kvantitativní stanovení vitamínu A a E za použití HPLC systému s UV detekcí a kolonou s reverzní fází C18. Množství vzorku plazmy nebo séra je stanoveno na 100 μ l. Citlivost 0,05 mg/ml. V protokolu výrobce byl uveden čas analýzy 30 minut pro úpravu vzorku a 15 minut chromatografie. Výrobce uvádí výtěžnost 101 % a mez detekce 1 mg/ml pro vit. E. Set činidel je alternativou předúpravy biologického vzorku, je však určen zatím jen pro vědecké účely.

6.3 Spektrofotometrická stanovení

6.3.1 Modifikace spektrofotometrické metody na mikrodestičkách [59]

Tato metoda je modifikací metody známé z roku 1964 (Robert G. Martinek, Baker a Frank). Jedná se o klasickou zkumavkovou metodu, při níž reaguje vitamin E s 2,2-bipyridylem a chloridem železitým, po extrakci vitamínu E ze séra xylenem, za vzniku červeného zbarvení, která byla nahrazena reakcí na mikrodestičkách bez vázaných protilátek (používané pro imunochemické reakce). Měření je možné pro desítky pacientů najednou, destička má 96 pozic. Navíc je možné využít pro spektrofotometrické měření přístroje pro ELISA stanovení, a tím zvýšit využití přístroje. Měření se provádí při 492 nm. Metoda je ovšem schopná kvantifikovat vit. E jako sumu a při stanovení se počítá s korekcí, kvůli interferenci vitamínu A.

Tabulka 11: Srovnání modifikované metody s metodou autorů Bakera a Franka [51]

Sample	(I) Baker and Frank method by using spectrophotometer at 460 and 520 nm α -Tocopherol ^a ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	(II) Our modified method by using ELISA reader at 492 nm α -Tocopherol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Percent change difference (I vs. II)
T ₁	13.71	13.77	0.43
T ₂	12.16	12.17	0.08
T ₃	10.96	10.94	0.27
T ₄	14.60	14.64	0.27
T ₅	8.95	8.96	0.11
T ₆	15.86	15.87	0.06
T ₇	10.00	9.95	0.05
T ₈	14.72	14.76	0.27
T ₉	9.71	9.70	0.10
T ₁₀	9.48	9.46	0.21
T ₁₁	8.95	8.96	0.11
T ₁₂	11.04	11.06	0.18
T ₁₃	11.45	11.43	0.17
T ₁₄	9.74	9.70	0.41
T ₁₅	12.50	12.54	0.32
Mean \pm SD	11.58 \pm 2.25	11.59 \pm 2.28	

6.4 Imunochemické metody

6.4.1 Vitamin E ELISA kit [60]

Analytický set (Antibodies, USA) obsahuje mikrodestičky s 96 pozicemi potaženými kožími protilátkami pro kompetitivní ELISA. Výrobce set doporučuje pro kvantitativní stanovení endogenního vitamínu E v séru, plasmě a homogenátu tkáně. Linearita je uvedena v rozmezí 0,2-40 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. Pro stanovení je potřeba 50-100 μl vzorku a čas

analýzy je 4,5 hodiny. Protilátka účastní se reakce je značená avidin-křenovou peroxidázou. Vzniká modré zbarvení, které je měřeno při vlnové délce 450 nm.

6.5 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

6.5.1 Separace α -, γ - a δ -tokoferolů metodou CEC s náplňovou kapilárou [37]

Příprava vzorku spočívala v deproteinaci ethanolem, a extrakci 3 podíly n-hexanu. Proti oxidaci byl vzorek chráněn BHT. Stanovení vitamínu E probíhalo v křemenné kapiláře (100 μm I.D., 365 μm O.D. \times 33 cm celková délka) plněné LiChrospher® 100 RP₁₈ (Merck, Německo) (5 μm). Mobilní fáze byla složena ze směsi methanolu a acetonitrilu, při různých koncentracích a 0,01 % (w / v) octanu amonného. Analýza proběhla na přístroji od firmy Hewlett-Packard (Německo) s UV detekcí. Limit detekce LOD byl stanoven na 10 $\mu\text{g/ml}$ a kvantifikace LOQ na 25 $\mu\text{g/ml}$ pro každý tokoferol. Délka analýzy byla 15 minut.

6.5.2 Separace α -, β -, γ - a δ -tokoferolů metodou CEC s monolitní kapilárou [61]

Ve studii byla poprvé použita monolitní kapilární kolona pro stanovení tokoferolů. Oproti kolonám s reverzní fází C8 nebo C18 používaných dříve, bylo použitím Peda-EDMA (pentaerythritol diacrylátmonostearát-ethylen dimethacrylát) monolitní kolony dosaženo oddělení i β - a γ - tokoferolu.

K separaci tokoferolů došlo v poměrně dlouhém čase, 25 minut. Jako mobilní fáze byla zvolena směs Tris pufr/methanol/acetonitril v objemovém poměru 3:10:87. Přístroj byl od firmy Hewlett Packard (Německo), vybavený detektorem s diodovým polem. Celková délka kapiláry byla 32 cm, efektivní délka 23,5 cm. Metoda byla úspěšně validována s výtěžností 93 %, a mezí detekce pod 1 ppm pro všechny tokoferoly i vnitřní standard tokoferol acetát.

7. VÝSLEDKY

Ve většině případů byla pro úpravu všech biologických vzorků použita extrakce do kapaliny - n-hexanu nebo jeho směsi s jiným organickým rozpouštědlem. Deproteinace byla vždy provedena ethanolem, i když existují i další neméně účinné možnosti, například v podobě acetonitrilu. Ethanol je ale nejlevnější možností. Asi v polovině analýz bylo také provedeno zmýdelnění tukových částic v matrici. Zmýdelnění má prokazatelně dobrý vliv na výtěžnost extrakce. Extrakce je možná i jinými technikami, např. SPE, mikro SPE [62], kdy byly použity mikrotitrační destičky Spe-ed s RP C18 a 96 pozicemi. Čas úpravy vzorku byl 1,5 hodiny/ 96 vzorků. Došlo tedy k velké úspoře času oproti klasické jednotlivé úpravě pomocí LLE, ale je potřeba analyzovat větší množství vzorků najednou, ideálně pokrýt všech 96 pozic destičky. Při úpravě vzorku je tedy třeba zvážit, kolik vzorků je v čase analýzy k dispozici a jaká metoda se použije dále k analýze, aby všechny vzorky po úpravě byly analyzovány a nedošlo k jejich znehodnocení (směnný provoz/malá laboratoř). Zajímavou metodou byla úprava vzorku on-line za pomoci předkolony s RAM materiálem, kdy byl vzorek pouze zředěn a centrifugován (minuty) a dávkován do analytického systému. Došlo tak k výrazné úspoře času a nákladům na analýzu.

K úspoře času a organických rozpouštědel došlo také při analýze s použitím core-shell technologie částic, místo monolytické kolony použité v referenční metodě [51]. Tyto analýzy však nedosáhly rozlišení píků β - a γ - tokoferolu. To platí i pro analýzu metodou kapilární elektrochromatografie, kde je nevýhodou ve srovnání s GC nebo HPLC ještě poměrně dlouhá doba analýzy jednoho vzorku (desítky minut). V minulosti se nejvíce stanovoval pouze α -tokoferol. Mělo se za to, že vykazuje největší biologickou aktivitu a proto se vývoj metod soustředil na jeho analýzu. Nicméně současné studie poukazují na to, že i ostatní formy mají důležitou biologickou funkci (např. studium vlivu γ -tokoferolu jako antioxidantní ochrany proti dusíkatým radikálům působícím nepříznivě při kardiovaskulárních chorobách a rakovině [63]). Rozlišení a kvantifikace je možné např. GC-MS analýzou, NP-HPLC-MS, CEC se stacionární fází Peda-EDMA nebo HPLC s RP na bázi pentafluorofenyly (solid-core technologie). Vše je shrnuto v následující tabulce (Tabulka 12).

Historicky nejstarší je stanovení spektrofotometrické. Je méně specifické, protože v barevné reakci interferuje retinol. Je nutné počítat s korekčním faktorem. Pro svou jednoduchost, přístrojovou nenáročnost, a v uvedené modifikaci na destičkách je i rychlá.

Imunochemické metody nejsou ve stanovení vitamínu E příliš využívané, pro svou časovou náročnost (hodiny) oproti minutám u chromatografie. K dostání na trhu je komerční set na stanovení vitamínu E a jeho kvantifikaci pomocí kalibrační přímky, ale výrobce set doporučuje jen k vědeckým aplikacím.

Tabulka 12: Shrnutí chromatografických metod

analyt	matrice	extrakce	metoda	SF	MF	detekce	čas analýzy	Ref.
vitamín A a E	plasma	LLE:isobutanol/isopropanol a on-line úprava na předkoloně RAM	HPLC	C18 (RP), monolitická	methanol/voda → methanol, gradientová eluce, 1,0ml/min	UV	11 min	49
vitamín A a E	sérum	LLE:n-hexan/dichlormethan, dvojnásobná	HPLC	C18 (RP), náplňová, 3μm	methanol/voda, izokraticky	UV	10 min	50
vitamín A a E	sérum	LLE:n-hexan/dichlormethan, dvojnásobná	HPLC	C18 (RP), náplňová, 5μm	methanol/voda, izokraticky		10 min	50
vitamín E	mléko	LLE:hexan	UHPLC	C18 (RP), náplňová, 1,7μm	Acetonitril/methan-ol, izokraticky, 0,6ml/min	UV-PDA	1,6min	54
vitamín E	mléko	LLE:hexan	UHPLC	C18 (RP), náplňová, 1,8μm	Acetonitril/methan-ol, izokraticky, 0,6ml/min	fluorescenční	1,6min	54
vitamín A a α-tokoferol	mléko	zmýdelnění KOH a LLE:hexan	HPLC	C18 (RP), monolitní	methanol, izokraticky, 2,5ml/min	UV-PDA	1,8min	51
vitamín A a α-tokoferol	mléko	zmýdelnění KOH a LLE:hexan	HPLC	C18 náplňová core-shell, 2,6μm	methanol, izokraticky, 1,5ml/min	UV-PDA	1,75min	51
vitamín A a α-tokoferol	mléko	zmýdelnění KOH a LLE:hexan	HPLC	C18 náplňová, core shell, 2,7μm	methanol, izokraticky, 1,5ml/min	UV-PDA	1,75min	51
vitamín E	mléko	LLE:hexan, s/bez zmýdelnění	HPLC	C18, monolitní,	acetonitril/voda→acetonitril, gradientová eluce	UV-PDA	1ml/min	52

analyt	matrice	extrakce	metoda	SF	MF	detekce	čas analýzy	referen ce
vitamín E a metabolity	moč, sérum, fekálie	LLE:hexan	HPLC	C18 (RP), náplňová 5µm	acetonitil/ethanol/voda s acetátem amonným, gradientová eluce	CEAS	50min	53
vitamín E a metabolity	tkáně	LLE:hexan, enzymatické štěpení a opět LLE:hexan	HPLC	C18 (RP), náplňová 5µm	acetonitil/ethanol/voda s acetátem amonným, gradientová eluce	CEAS	50min	53
vitamín E a metabolity	moč, sérum, fekálie	LLE:hexan	HPLC	C18 (RP), náplňová 5µm	acetonitil/ethanol/voda s acetátem amonným, gradientová eluce	ESI-MS	50min	53
vitamín E a metabolity	tkáně	LLE:hexan, enzymatické štěpení a opět LLE:hexan	HPLC	C18 (RP), náplňová 5µm	acetonitil/ethanol/voda s acetátem amonným, gradientová eluce	ESI-MS	50min	53
α-,β-,γ-, δ-tokoferolů	sérum, plodová voda	LLE:hexan po zmýdelnění, derivatizace, LLE:acetonitril	GC	nepolární tenká vrstva pro teploty do 400°C	He, 1,1ml/min	EI-MS	5min	55
α-,β-,γ-, δ-tokoferolů i tokotrienolů	plasma, jaterní tkáň	LLE:hexan po zmýdelnění	HPLC	RP na bázi pentafluorfenylu 2,6 µm	methanol/voda, 0,8 ml/min	FD	15 min	57
α-,β-,γ-, δ-tokoferolů i tokotrienolů	plasma	LLE:hexan/1,4-dioxan, dvojnásobná	HPLC	propylaminová (NP), náplňová, 3µm	hexan→hexan/1,4-dioxan, gradientová eluce	APCI-MS	15min	56
α-,β-,γ-, δ-tokoferolů	biologický vzorek, farmacie	/	CEC	Pedas-EDMA, monolitní	TRIS/methanol/acetonitril	UV	25min	61
α-,β+γ-, δ-tokoferolů	sérum	LLE:hexan	CEC	C18 (RP), náplňová 5µm	methanol/acetonitril/ocetan amonný	UV	25min	37

8. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit přehled současných metod stanovení vitamínu E, v různých biologických matricích. V současnosti jsou nejvíce využívané metody chromatografické, hlavně vysokoúčinná a ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi. Tyto dvě metody poskytují spolehlivé a rychlé výsledky. Jsou používány i v rutinní analýze. Specifika chromatografických metod byla uvedena v tabulce 12. Z tabulky vyplývá, že volba metody závisí např. na přístrojové vybavenosti laboratoře, na požadavku rozdělit a kvantifikovat všechny izomery vitamínu E (případně metabolity) a na rychlosti analýzy.

Metody imunochemické a spektrofotometrické jsou v klinické praxi pro stanovení vitamínu E méně významné. Neposkytují tak rychlé výsledky a neumožňují analyzovat jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly. U imunochemických aplikací lze ale očekávat v dalších letech vývoj a posun z vědeckých analýz do běžné praxe.

V minulosti se nejvíce stanovoval pouze α -tokoferol. V současnosti je nutností stanovit všechny složky vitamínu E a případně i jeho metabolity. V příštích letech je tedy možné očekávat vývoj dalších nových metod, které umožní rozdělení všech izoform vitamínu a jejich kvantifikaci v řádech piko a fentomolů. Tyto údaje by mohly sloužit např. v pediatrii, kde je požadavek na co nejmenší odebrané množství krve nebo ve studiu výživy populace s požadavkem na zpracování velkého množství vzorků a nízké ceny analýzy, a pomoci tak k prevenci některých civilizačních chorob.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
Aq	vodný roztok
BHT	butylovaný hydroxytoluen
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropansulfonová kyselina
CEAS	elektrochemický detektor s diodovým polem
CEC	kapilární elektrochromatografie
CI	chemická ionizace
CL	chemiluminiscence
EI	elektronová ionizace
ELISA	Imunochemický test s enzymem značenou protilátkou
ELSD	odpařovací detektor rozptylu světla
EOF	elektroosmotický tok
ESI	ionizace elektrosprejem
FAB	ionizace rychlými atomy
FID	Plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
GLC	plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází na pevném nosiči
GPC	gelová permeační chromatografie
GSC	plynová chromatografie s pevnou SF
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou
LLC	kapalinová rozdělovací chromatografie
LLE	extrakce kapalin-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
LSC	kapalinová adsorpční chromatografie
MALDI	desorpce za přítomnosti matrice
Me	methylová skupina
MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NP	normální fáze
PC	papírová chromatografie
PD	desorpce plasmou
PDA	detektor s diodovým polem

Pedas-EDMA	pentaerytritoldiakrylát monostearát-ethyl dimethylakrylát
PLOT	chemicky vázaná pevná fáze
RAM	materiál s omezeným přístupem
RP	reverzní fáze
SALDI	desorpce za přítomnosti pevných částic
SCOT	stacionární fáze s vázaným polymerem
SDS	dodecylsírán sodný
SF	stacionární fáze
SIM	skan molekulových iontů
SPE	extrakce na pevnou fázi
SPME	mikroextrakce na pevnou fázi
TCD	tepelně-vodivostní detektor
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	průletový analyzátor
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminometan
TSC	tenkovrstvá adsorpční chromatografie
TSI	ionizace termosprejem
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
WCOT	stacionární fáze potažená kapalným polymerem
α-TTP	alfa tokoferol transportní protein

10. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Doporučené denní dávky

Tab. 2: Fyziologické hodnoty

Tab. 3: Tokoferoly

Tab. 4: Tokotrienoly

Tab. 5 Přepočet jednotek

Tab. 6: Porovnání druhů kapilárních kolon

Tab. 7: Přehled běžně používaných precipitačních činidel

Tab. 8: Hodnoty retenčních časů, rozmezí kvantifikace, regrese a nejnižší bod kvantifikace tokoferolů v séru a plodové vodě

Tab. 9: Seznam tokoferolů, tokotrienolů a jejich metabolitů stanovovaných v matrici

Tab. 10: Limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ), linearita, opakovatelnost, přesnost

Tab. 11: Srovnání modifikované metody s metodou autorů Bakera a Franka

Tab. 12: Shrnutí chromatografických metod

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Redukce volných radikálů

Obr. 2: Systém antioxidantní ochrany buňky.

Obr. 3: Tocol= 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl) chroman-6-ol

Obr. 4: Tokotrienol

Obr. 5: D- α -tokoferol

Obr. 6: Schéma plynového chromatografu

Obr. 7: Průřezy kapilárních kolon

Obr. 8: Multikapilární kolona

Obr. 9: TCD=katharometr

Obr. 10: Plaměnově-ionizační detektor

Obr. 11: Kapalinový chromatograf

Obr. 12: ELSD

Obr. 13: Konstrukce UV-VIS detektoru

Obr. 14: Detektor s diodovým polem

Obr. 15: Fluorescenční detektor

Obr. 16: Toky kapaliny v HPLC, CE a CEC

Obr. 17: SPE-různá uspořádání

Obr. 18: Porovnání chromatogramů stanovení retinolu a alfa-tokoferolu pěti různými kolonami

Obr. 19: Reprezentativní chromatogram vzorku mléka

Obr. 20: Derivatizační reakce

Obr. 21: Hmotnostní spektra tokoferolů (elektronová ionizace=EI)

Obr. 22: Reprezentativní chromatogram vzorků myších jater a lidské plasmy

12. POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Hlúbik P., Opltová L.: *Vitaminy*. Praha, Grada, Avicenum, 2004. ISBN 80-247-0373-4.
- 2) MUDr. Božena Jurašková, Ph.D.: *Význam vitamínů a stopových prvků ve stáří*. [přednáška]. In: gepa.cz [online]. (vid. 26.3.2014).
- 3) Kennard Ch.: *Vitamin E Treatments in Alzheimer's*. In: About Health [online]. About, 2005. (vid. 26.3.2014). Dostupné z: <http://alzheimers.about.com/od/treatmentoptions/a/vitaminE.htm>
- 4) Eitenmiller R. R., Landen W. O.: *Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences*, CRC Press LLC, Georgia, 1998. ISBN 978-0849326684
- 5) Petr: *Radikály a antioxidanty*. [přednáška]. 2009. In: 3. lékařská fakulta, Karlova Univerzita [online]. (vid. 26.3.2014). Prezentace dostupná z lf3.cuni.cz/opencms...prednasky/radikaly_antioxidanty_pt_2009.pdf
- 6) Traber, MG: *Moderní Výživa ve zdraví a nemoci*. 9. vydání, 1999. Editoval Maurice Shils, James Olson, Moshe Shike a A. Catharine Ross. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.
- 7) Bender D. A.: *Nutritional Biochemistry of the Vitamins*. Cambridge University Press, New York, 2. vydání, 2003. ISBN 978-0-511-06365-7.
- 8) Rucker R. B., Suttie J. W., McCormick D. B., Machlin L. J.: *Handbook of Vitamins*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001. ISBN 08247-0428-2.
- 9) Bjorneboe A., Bjorneboe G. Aa., Drevon Ch. A.: *Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E*. The Journal of Nutrition [online]. 1990, s. 233-242.
- 10) Dr. Bryan Helwig, PhD.: *Nutrition and exercise*. [online]. In: ExRx.net diet and nutrition (2014). Dostupné z: www.exrx.net/Nutrition/Antioxidants/VitaminE.html
- 11) *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi* [online]. Antonín Jabor et al., ©2011. (vid. 13.6.2014). Dostupné z: www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVASE.htm
- 12) Vávrová J., Pechová A., Wilhem Z., Kazda A., Friedecký B., Jabor A.: *Vitaminy a stopové prvky*. ČSKB ČLS JEP a SEKK spol. s r.o., Praha, 2007. ISBN 978-80-254-1171-1
- 13) *Nedostatek vitamínu A, D, E a K*. Vitalion [online]. 2014. Článek dostupný z: <http://nemoci.vitalion.cz/nedostatek-vitaminu-a-d-e-k/>
- 14) IUPAC: *Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds* [online]. 2014. Dostupné z: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/toc.html>
- 15) Hosmanová R., Douša M.: *HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách*. Chemické listy, 101, (2007), s. 578-583
- 16) Ing. Tereza Burianová, Csc.: *Vitaníny* [online], 2002/2003. In: Informační server pro lékárny Solutio. Medon, s.r.o. (vid. 14.6.2014).

- 17) Akihiro Hosomi et.al.: *Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs*, FEBS Letters, Volume 409, Issue 1, str. 105-108
- 18) Leth T, Sondergaard H.: *Biological activity of vitamin E compounds and natural materials by the resorption-gestation test, and chemical determination of the vitamin E activity in foods and feeds*. The Journal of Nutrition (1977), 107(12): str. 2236-2243
- 19) Vodrážka Z.: *Biochemie 3*. ACADEMIA, Praha, 1993, s. 160-165. ISBN 80-200-0471-8
- 20) *Sigma Aldrich* [online]. Sigma-Aldrich Co. LLC, ©2014. Dostupné z: www.sigmaaldrich.com
- 21) Michal Douša: *News from HPLC analysis* [online]. ©2014. (vid. 14.6.2014). Dostupné na <http://hplc1.sweb.cz>
- 22) Radomír Cabala: *GC-základy teorie* [přednáška, online]. In: Přírodovědecká fakulta UK v Praze. (vid. 20.7.2014). Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz>
- 23) Klouda Pavel: *Moderní analytické metody*. Ostrava, 2003. ISBN: 80-86369-07-2
- 24) ČSN EN 12822 - Potraviny - Stanovení vitamínu E metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - Měření alfa-, beta-, gama- a delta-tokoferolu. (1.1.2015)
- 25) Eldiag, s.r.o. [online]. *Seznámení s plynovou chromatografií*. (2014). (vid. 4.11.2014). Dostupné online na <http://www.eldiag.cz/cz/texty/seznameni-s-plynovou-chromatografií>
- 26) Kateřina Riddelová: *Izolační a separační metody-GC kolony*. [online, učební text VŠCHT Praha], 2014.
- 27) *Multikapilární kolony* [online katalog firmy]. Multichrom, Ltd (©2009). Dostupné z: <http://mcc-chrom.com/about>
- 28) Poustka J.: *Konvenční detektory GC* [přednáška, online], 2007. In: VŠCHT Praha. Dostupné na: <http://web.vscht.cz/~poustkaj/SAP%20N3%20032013%20PREDNASKA%203.pdf>
- 29) Ivan Mikšík: *Detekce a detektory* [přednáška, online], UPa, Fakulta chemicko-technologická, 2014. Dostupné na: wz.analyt.cz
- 30) Tupa: *Návod na lab. cvičení z fyzikální chemie a instrumentální analýzy*. Masarykova střední škola chemická, Praha, 2012.
- 31) Anonymus. *Gas chromatography* [učební text online], Sheffield Hallam University, 2014. Dostupné na: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschr.htm>
- 32) Anonymus. Učební texty Masarykovy univerzity [online], (vid. 11.11.2014) Dostupné na: <http://cheminfo.chemi.muni.cz>
- 33) Hernychová L.: *Základy hmotnostní spektrometrie* [přednáška, online]. Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové, 2014.

- 34) György Hegyi et al.: *Introduction to Practical Biochemistry-HPLC* [učební text online]. Eötvös Loránd University, 2014. Dostupné na: http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practical_biochemistry/h06s05.html
- 35) Anonymus. *HPLC* [online], 2007. Dostupné na: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- 36) Department of Chemistry, University of Maine. *Chromatography*, 2014. Dostupné na <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/Chroma.html>
- 37) Fanali S. et al.: *Separation of δ -, γ - and α -tocopherols by CEC*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 29, Issue 6, 1 August 2002, Pages 973–979
- 38) Kolektiv autorů ústavu 402 VŠCHT Praha: *AK skripta* [online], 2014. Dostupné na: http://fchi-oppa.vscht.cz/uploads/AK-skripta/Kap_8.pdf
- 39) Wake Forest University. *HPLC Detektors* [online prezentace], 2014. Dostupné na: <http://www.wfu.edu/chemistry/courses/jonesbt/334/>
- 40) Michal Douša: *Hplc.cz*, 2013. Dostupné na: <http://www.hplc.cz/>
- 41) Robert Plumb et al.: *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. Volume 18, Issue 19, strana 2331–2337, 2004.
- 42) Beckman Coulter. *Capillary chromatography*, 1999.
- 43) Mencer D.E.: *Elektrochromatography- A Hybrid Separation Technique* [online přednáška], 2014. (vid. 11.11.2014). Dostupné na: www.chem.wilkes.edu/~mencer/.../Electro_Seps.ppt
- 44) Zápotocký: *Návod-spektrofotometrie* [studijní materiály], 1. LF UK, 2012
- 45) Zajoncová: *Imunochemické metody*[studijní materiály], Katedra biochemie, Univerzita Palackého, Olomouc, 2009.
- 46) Ivan Mikšík: *Precipitace* [studijní materiály], UPa, Fakulta chemicko-technologická, 2004. Dostupné na: <http://analyt.wz.cz/Priprava/precipitace.pdf>
- 47) Prof. MVDr. Lenka Vorlová, PhD.: *Fyzikálně-chemické parametry potravin živočišného původu významné pro bezpečnost a kvalitu potravin* [multimediální učební pomůcky], VFU Brno, 2013.
- 48) Sadílek P.: *Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek*, disertační práce, FaF UK, 2012.
- 49) Sadílek P. et al.: *Rapid and simple determination of vitamin A and vitamin E in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography*, Current Analytical Chemistry, 2009, (svazek 5, číslo 4).
- 50) Abad Khan et al.: *An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-Retinol (Vitamin A) and α -Tocopherol (Vitamin E) in human serum: Comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns*, Journal of Chromatography B, Volume 878, Issue 25, 1 September 2010, Pages 2339–2347

- 51) Plíšek J. et al.: *Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk*, Talanta Volume 107, 30 March 2013, Pages 382–388
- 52) Korchazhkina O. et al.: *HPLC WITH UV DETECTION FOR MEASUREMENT OF VITAMIN E IN HUMAN MILK*, Acta chromatographica 2006, číslo 16, Dostupné na: us.edu.pl
- 53) Zang Zhao et al.: *Analysis of Multiple Metabolites of Tocopherols and Tocotrienols in Mice and Humans*, J Agric Food Chem. Apr 28, 2010; 58(8): 4844–4852
- 54) Moltó-Puigmartí C. et al.: *Ultra-High-Pressure Liquid Chromatographic method for the analysis of tocopherols in human colostrum and milk*, Journal of Chromatography A 04/2009; 4388-94
- 55) Řimnáčová L. et al.: *A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography–mass spectrometry*, Journal of Chromatography A Volume 1339, 25 April 2014, Pages 154–167
- 56) Nagy K. et al.: *Comprehensive Analysis of Vitamin E Constituents in Human Plasma by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, Anal. Chem., 2007, 79 (18), pp 7087–7096
- 57) Nadine Grebenstein, Jan Frank: *Reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver*, Institute of Biological Chemistry and Nutrition, University of Hohenheim, D-70599 Stuttgart, Germany, Journal of Chromatography A, 1243 (2012) 39– 46
- 58) Alpco. *Vitamin A/E HPLC kit®*, 2008.
- 59) Jargar JG et al.: *A modified simple method for determination of serum α -tocopherol (vitamin E)*, J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2012 Jan 19;23(1)
- 60) Antibodies. *Vitamin E ELISA kit®*, 2014.
- 61) Patcharin Chaisuwan et al.: *Separation of α -, β -, γ -, δ -tocopherols and α -tocopherol acetate on a pentaerythritoldiacrylate monostearate-ethylenedimethacrylate monolith by capillary electrochromatography*, Elektrophoresis 2008, 29, 2301-2309
- 62) Krčmová L., Solichová D., Plíšek J., Kašparová M., Sobotka L., Solich P.: *Miniaturisation of solid phase extraction method for determination of retinol, alpha- and gamma-tocopherol in human serum using new technologies*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 90(2), 2010, 106-114.
- 63) Shi J.D. et al.: *Tocopherol supplementation reduces NO production and pulmonary inflammatory response to bleomycin*, Elsevier, 2013 Volume 34, 1 November 2013, Pages 27–36, 1 November 2013, Pages 27–36.