

Možnosti stanovení vitamínu E metodou HPLC

Lenka Jelínková

Bakalářská práce
2008



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka JELÍNKOVÁ**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Možnosti stanovení vitamínu E metodou HPLC**

Zásady pro vypracování:

1. Teoreticky zpracovat fyziologii vitamínu E.
2. Popsat základy kapalinové chromatografie.
3. Navrhnout možnosti stanovení vitamínu E metodou HPLC dle původu potravin.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

VELÍŠEK, J. Chemie potravin 2, OSSIS, Tábor 1999

HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. Potravinářská biochemie II, UTB Academica centrum Zlín, Zlín 2006

KARDOŠ, E., BEREK, D. Základy kvapalinovej chromatografie, ALFA Bratislava, 1978

HOSMANOVÁ, R., DOUŠA, M. HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách, Chemické Listy, 101, 2007, s.578-583

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

20. listopadu 2007

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2008

Ve Zlíně dne 12. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na získání informací o vitamínu E a možnostech jeho stanovení vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Vitamin E patří mezi vitaminy rozpustné v tucích a je významným antioxidantem. Nachází se především v rostlinných olejích, jádrech ořechů, másle, mléku a vnitřnostech. Cílem práce je najít izolační postupy a následné stanovení vitamínu E v potravinách.

Klíčová slova: vitamin E, HPLC

ABSTRACT

This work is focused on getting information about vitamin E and possibilities of its determination by HPLC method. Vitamin E comes under fat soluble vitamins and is an important antioxidant. Main sources of this vitamin are vegetable oils, nuts, butter, milk and offal. The aim of this work is find isolation techniques and consequential determination vitamin E in foodstuffs.

Keywords: vitamin E, HPLC

Tímto bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Kramářové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných připomínek a trvalý zájem při vypracovávání bakalářské práce. Také děkuji své rodině za podporu během studia.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	8
1 VITAMIN E	9
1.1 VLASTNOSTI VITAMINU E	10
1.2 ZDROJE VITAMINU E.....	12
1.3 HYPOVITAMINOSA A HYPERVITAMINOSA.....	13
1.4 DENNÍ DOPORUČENÁ DÁVKA	14
1.5 POTRAVINOVÉ DOPLŇKY S VITAMINEM E	14
2 CHROMATOGRRAFIE	15
2.1 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	15
2.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE - HPLC	16
2.3 ZÁKLADNÍ POJMY	17
2.4 SCHÉMA KAPALINOVÉHO CHROMATOGRAFU	18
2.4.1 Zásobník mobilní fáze	18
2.4.2 Čerpadlo mobilní fáze	19
2.4.3 Dávkovače vzorku.....	19
2.4.4 Kolony	20
2.4.5 Detektory	20
2.4.6 Stacionární a mobilní fáze.....	23
2.4.7 Vyhodnocení	24
3 STANOVENÍ VITAMÍNU E METODOU HPLC	25
3.1 STANOVENÍ VITAMINU E V KRMNÝCH SMĚSÍCH A POTRAVINÁCH	25
3.1.1 Princip	25
3.1.2 Chemikálie a vzorky.....	25
3.1.3 Pracovní postup	25
3.1.4 Chromatografické podmínky.....	26
3.2 STANOVENÍ VITAMINU E V KRMÍVECH A PREFIXECH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK	26
3.2.1 Princip	26
3.2.2 Chemikálie a vzorky.....	26
3.2.3 Pracovní postup	27
3.2.4 Chromatografické metody	27
3.3 STANOVENÍ VITAMINU E V MARGARINU A TUCÍCH	28
3.3.1 Princip	28
3.4 STANOVENÍ VITAMINU E VE ZRALÝCH SÝRECH.....	28
3.4.1 Přístroje a zařízení.....	28
3.4.2 Chemikálie a vzorky.....	29
3.4.3 Chromatografické podmínky.....	29
3.4.4 Zmýdelnění.....	30
3.4.5 Extrakce.....	30

3.5	STANOVENÍ VITAMINU E V MATEŘSKÉM MLÉCE	30
3.5.1	Chemikálie a vzorky.....	30
3.5.2	Metoda I	31
3.5.3	Metoda II	31
3.5.4	Chromatografický systém a podmínky.....	31
3.6	STANOVENÍ VITAMINU E V KRAVSKÉM MLÉCE	32
3.6.1	Princip	32
3.6.2	Přístroje a zařízení.....	32
3.6.3	Chemikálie a vzorky.....	32
3.6.4	Chromatografické podmínky.....	33
3.6.5	Zmýdelnění.....	33
3.6.6	Extrakce.....	33
3.7	STANOVENÍ VITAMINU E V HOVĚZÍ SVALOVINĚ	34
3.7.1	Chemikálie a vzorky.....	34
3.7.2	Zmýdelnění a extrakce	34
3.7.3	Chromatografické podmínky.....	34
3.8	STANOVENÍ VITAMINU E V ROSTLINNÝCH OLEJÍCH.....	35
3.8.1	Chromatografický systém a podmínky.....	35
3.9	STANOVENÍ VITAMINU E V LIDSKÉ PLAZMĚ	35
3.9.1	Chemikálie a vzorky.....	35
3.9.2	Chromatografický systém a podmínky.....	35
3.9.3	Příprava vzorku	36
	ZÁVĚR	37
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	42
	SEZNAM OBRÁZKŮ	43
	SEZNAM TABULEK.....	44
	SEZNAM PŘÍLOH.....	45

ÚVOD

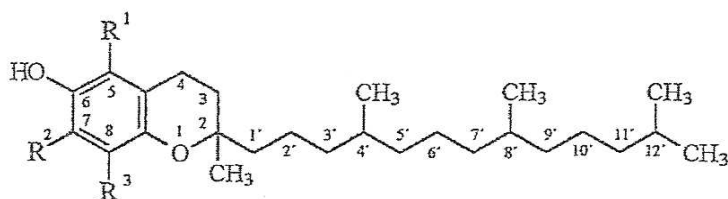
Vitaminy jsou exogenní nízkomolekulární sloučeniny patřící mezi základní složky potravy. Jsou esenciální pro lidský organismus, ovlivňují téměř všechny jeho funkce, od imunitního systému až po správnou funkci metabolismu. Jejich nedostatek (lehčí forma – hypovitaminóza, těžší forma - avitaminóza) nebo jejich přebytek (hypervitaminóza) může způsobit zdravotní komplikace. Vitaminy se podle rozpustnosti dělí na dvě skupiny, rozpustné v tucích – lipofilní (A, D, E, K) a rozpustné ve vodě – hydrofilní (C, B). V dnešní době plné stresu, znečištěného životního prostředí a rychlého občerstvení je třeba zvýšit přísun vitaminů, a to zejména pestrou stravou a konzumací potravin bohatých na vitaminy.

Tato práce je zaměřena na vitamin E, což je souhrnný název pro osm derivátů tokoferolu a tokotrienolu. Jejich biologická aktivita je různá. Vitamin E je rozpustný v tucích a je také nejvýznamnějším přirozeným antioxidantem. Jeho zdrojem jsou především potraviny rostlinného původu, například oleje, obilné klíčky, ořechy a listové zelenina. Z živočišných produktů jsou to vejce, máslo, mléko, králičí a vepřové maso, játra a ostatní vnitřnosti. Při jeho nedostatku se mohou objevit problémy s reprodukcí či srážlivostí krve. Hypervitaminóza je vzácná.

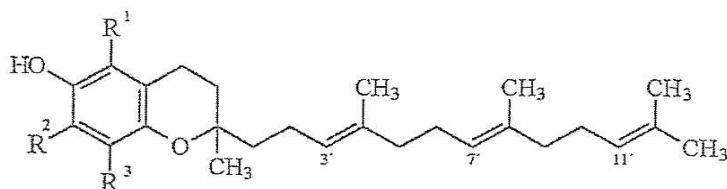
Cílem této bakalářské práce bylo provést rešerši o možnostech využití metody HPLC ke stanovení vitaminu E. Vysokoučinná kapalinová chromatografie se hojně využívá díky svým nesporným výhodám jako je rychlost, účinnost, citlivost, snadná reprodukovatelnost měření nebo možnost automatického vyhodnocení naměřených dat. Ke stanovení všech forem tokoferolů se využívá normální HPLC s fluorescenčním detektorem, v současnosti je upřednostňována reverzní HPLC (RP-HPLC).

1 VITAMIN E

Ve 20. letech minulého století byl v lipidových složkách potravy pro krysy nalezen esenciální faktor s výrazným antisterilitním účinkem, který byl pojmenován jako vitamin E. [1] Doposud bylo z rostlinných materiálů izolováno osm derivátů tokolu [2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl)-6-hydroxychromanu] nebo tokotrienolu [2-methyl-2-(4',8',12'-trimethyltridecyl-3',7',11'-trienyl)-6-hydroxychromanu], které projevovaly biologické účinky vitaminu E a tvoří zároveň jeho strukturní skelet. Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší počtem a polohou methylových skupin na chromanovém jádře. Nejvýznamnější z nich je 5',7',8'-trimethyltokol nazývaný α -tokoferol, dále následují dva dimethyltokoly β -tokoferol a γ -tokoferol, které však mají jen 40 % biologickou aktivitu α -tokoferolu. Biologická aktivita klesá přímo úměrně s počtem methylových skupin. Základní látkou je α -tokoferol, ale v přírodních materiálech se vyskytuje i β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol a jim příbuzné α -, β -, γ -, δ -tokotrienoly se třemi dvojnými vazbami v postranním řetězci. [2,3,4]



<i>Tokoferoly:</i> $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	<i>5,7,8-trimethyltokol, α-tokoferol</i>
$R^1 = R^3 = CH_3, R^2 = H$	<i>5,8-dimethyltokol, β-tokoferol</i>
$R^1 = H, R^2 = R^3 = CH_3$	<i>7,8-dimethyltokol, γ-tokoferol</i>
$R^1 = R^2 = H, R^3 = CH_3$	<i>8-methyltokol, δ-tokoferol</i>
$R^1 = R^2 = R^3 = H$	<i>tokol</i>



<i>Tokotrienoly:</i> $R^1 = R^2 = R^3 = CH_3$	<i>5,7,8-trimethyltokotrienol, α-tokotrienol</i>
$R^1 = R^3 = CH_3, R^2 = H$	<i>5,8-dimethyltokotrienol, β-tokotrienol</i>
$R^1 = H, R^2 = R^3 = CH_3$	<i>7,8-dimethyltokotrienol, γ-tokotrienol</i>
$R^1 = R^2 = H, R^3 = CH_3$	<i>8-methyltokotrienol, δ-tokotrienol</i>
$R^1 = R^2 = R^3 = H$	<i>tokotrienol</i>

Tabulka č.1: Vlastnosti α -tokoferolu

α -tokoferol	
Sumární vzorec	$C_{29}H_{50}O_2$
Molekulová hmotnost	430,69 g.mol ⁻¹
Hustota	0,950 g.cm ⁻³
Bod tání	2,5-3,5°C
Bod varu	200-220°C

1.1 Vlastnosti vitamínu E

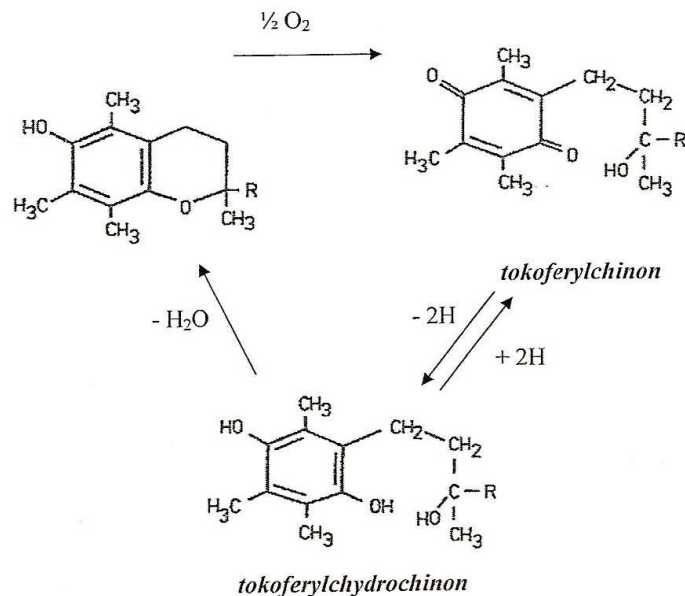
Všechny přirozené tokoferoly jsou opticky aktivní, vesměs pravotočivé, syntetické jsou racemické. Optická aktivita má na rozdíl od počtu methylových skupin v tokolové molekule jen malý vliv na jejich biologický účinek. [5]

Tokoferoly jsou za normální teploty téměř bezbarvé nebo jen slabě žluté viskózní oleje, dobře rozpustné v lipidech a organických nepolárních rozpouštědlech. Při nižších teplotách jsou vůči alkáliím stálé, za vyšších teplot se rozkládají. V kyselém prostředí jsou stálé i při 100°C. [4]

Tokoferoly patří mezi významné antioxidanty eukaryotických buněk a zabraňují destruktivnímu neenzymovému působení molekulárního kyslíku na dvojné vazby nenasycených mastných kyselin vázaných v tkáňových lipidech. Vitamin E tak ochraňuje citlivý mitochondriální systém před jeho ireverzibilní inhibicí peroxidy mastných kyselin z lipidů. Tuto funkci plní společně se sirtými aminokyselinami a selenem. [1] Vitamin E snižuje spotřebu selenu tím, že brání jeho ztrátám nebo jej udržuje v aktivní formě. [6] Podílí se na tvorbě lipoproteinové frakce krve, která se zúčastňuje transportu tokoferolů. [4]

Antioxidační schopnost tokoferolů vyplývá ze snadné oxidace za vzniku tokoferylchinonů v játrech, které mohou být redukovány na tokoferylhydrochinony. Z nich potom cyklizací vznikají opět tokoferoly. Vytvářejí tak v organismu důležitou oxidačně redukční soustavu. Rychlou reakcí α -tokoferolu s peroxylovými radikály vznikají relativně stabilní tokoferoxylové radikály, které mohou být například regenerovány reakcí s vitamínem C či jiným antioxidantem jako je např. glutathion. V krevním řečišti je vitamin E transportován

asociovaný s lipidovou frakcí LDL. Každá částice LDL lipoproteidů obsahuje asi šest molekul vitamínu E. Bylo prokázáno, že suplementace α -tokoferolem zvyšuje rezistenci LDL proti oxidačnímu působení. [1] 65 % tokoferolu je přenášeno LDL, 8 % v VLDL a 24 % v HDL frakci. [7]



Teprve v posledních letech byly stanoveny tzv. F_2 -isoprostany, isomery prostaglandinu F_2 , které jsou pokládány za ukazatel tvorby volných radikálů a oxidativního poškození lipidů *in vivo*. F_2 -isoprostany vznikají v membránách z lipidů obsahujících kyselinu arachidonovou, a to buď působením *cyklooxygenasy*, nebo během peroxidace lipidů. Speciální chemická role je připisována γ -tokoferolu. Je to silný nukleofil, který vycytává elektrofilní mutageny v lipofilních složkách. Doplnuje tak činnost glutathionu. Jedním z mutagenů, který s ním reaguje přednostně je peroxyinitrit, a tím γ -tokoferol chrání DNA, proteiny a lipidy. Vitamin E taktéž ovlivňuje buňky hladké svaloviny cévní stěny, inhibuje proliferaci buněk hladkého svalstva. [2]

Vitamin E je považován za „faktor zpomalující proces stárnutí organismu“ a uplatňuje se v menší míře v prevenci kardiovaskulárních chorob a vzniku rakoviny (*ontogeneze*). [2,3] Naopak doposud nebylo zcela prokázáno snížení incidence infarktu myokardu ani cévní mozkové příhody. Je také jednou z látek, které pomáhají snižovat rizika autoimunity. [8] Autoimunita je stav, při kterém některá ze složek imunitního systému reaguje na struktury organismu a tím je poškozuje. Příkladem autoimunitního onemocnění je roztroušená skleróza či revmatoidní artritida. [9]

Absorpce vitamínu E probíhá v tenkém střevě a účinnost vstřebávání závisí na povaze tuku, který je s ním současně vstřebáván. Nasycené mastné kyseliny absorpci podporují, zatímco polynenasycené nikoli, dokonce ji mohou inhibovat. Majoritní většina vstřebeného vitamínu E je transportována do lymfy, zbytek (asi 10 %) do krve. [2]

Při rafinaci olejů dochází ke snížení obsahu vitamínu E na 10-50 % původního obsahu. K hlavním ztrátám dochází při odkyselování (v důsledku oxidace vitamínu v alkalickém prostředí) a při bělení (oxidací povrchu bělicích hlinek katalyzovanou hlavně železitými ionty). Při dezodoraci jsou ztráty způsobeny hlavně těkáním s vodní párou za sníženého tlaku. Při hydrogenaci tuků za použití niklových katalyzátorů činí ztráty vitamínu 30-50 %. [3] Tokoferoly a tokotrienoly se snadno oxidují, např. železitými ionty, hydroperoxydy lipidů, ozonem a jinými oxidačními činidly, za vzniku příslušných chinonů. Tyto látky jsou rovněž citlivé ke slunečnímu záření (zejména UV spektru). V nepřítomnosti kyslíku a oxidovaných lipidů je vitamin E poměrně stabilní při běžných způsobech kulinárního a průmyslového zpracování potravin. [10] Během zpracování a skladování masa, masných výrobků, mléka, mléčných výrobků a cereálií obvykle nepřesahují ztráty 10 %. K největším ztrátám naopak dochází při smažení a pečení. V tucích používaných opakovaně pro smažení potravin se tokoferoly prakticky nevyskytují, neboť za vyšších teplot degradují právě tak, jako ve smažených a mrazírensky skladovaných výrobcích jako jsou přesmažené bramborové hranolky. Obsah vitamínu E postupně klesá i při mrazírenském uchovávání potravin obsahujících vyšší množství polyenových mastných kyselin. Při sušení ovoce a zeleniny dochází ke ztrátám z 50-70 %. [3]

1.2 Zdroje vitamínu E

Vitamin E se nachází především v potravinách rostlinného původu, v menším množství v potravinách živočišného původu a také v některých kvasinkách a houbách. V potravinách se vyskytuje všech osm biologicky aktivních tokoferolů a tokotrienolů. Samotný tokol a tokotrienol se v přírodě nevyskytují. [3]

Tokoferoly jsou rozšířeny zejména v rostlinných olejích, jádrech ořechů, kukuřici, hrášku, ovesné mouce, slunečnicových semínkách a listové zelenině. Z živočišných produktů jsou to vejce, máslo, mléko, králičí a vepřové maso, játra a ostatní vnitřnosti. Obzvláště bohatý na vitamin E je olej z obilných klíčků, dále olej řepkový a slunečnicový. Více vitamínu E obsahují oleje panenské (surové) než oleje rafinované. γ -tokoferol se hojně nachází

v sojovém oleji. V obilovinách je vitamin lokalizován převážně v klíčku a otrubách, proto mají bílé mouky nižší obsah vitaminu než mouky celozrnné. Na rozdíl od jiných lipofilních vitaminů se vitamin E nevyskytuje ve větším množství v rybím tuku. [2,3,11,12,13,14]

Tabulka č.2: Obsah vitaminu E ve vybraných potravinách

Potravina	Obsah vitaminu E [mg] v 1kg jedlého podílu	Potravina	Obsah vitaminu E [mg] v 1kg jedlého podílu
hovězí maso libové	5,0	hrášek zelený	30,0
párky	7,3	mrkev	20,0
vepřový kotlet	6,2	paprika	8,0
vepřové maso tučné	11,0	rajče	12,2
játra hovězí	10,0	špenát	25,0
kapr	5,0	žampiony	8,3
králík	10,0	jablko	5,9
kuře	2,1	broskev	6,0
makrela	16,0	ořechy vlašské	200,0
máslo	0,02	ořechy burské	200,0
margarín	7,0	mouka pšeničná	14,0
palmový olej	100,0	ovesné vločky	37,0
sádlo vepřové	22,0	piškoty	42,0
vejce slepičí	10,0	rýže	10,2
brambory	0,6	chléb žitno - pšeničný	12,0

1.3 Hypovitaminosa a hypervitaminosa

Hypovitaminosa se u lidí projeví změnou v reprodukčním systému, svalstvu, nervové či cévní soustavě, u dětí byla pozorována změna krvevorbny – anémie, způsobená snížením produkce hemoglobinu a zkrácením životnosti červených krvinek. Nedostatek vitaminu E

je také často spojen s poruchami vstřebávání nebo distribuce tuků, jako je *chronická steatorhea*, *abetalipoproteinemie* či cystická fibróza. [2,13]

V porovnání s jinými vitaminy rozpustnými v tucích je tokoferol relativně málo toxický, hypervitaminosa se vyskytuje zřídka. Při suplementaci vysokými dávkami tokoferolu se mohou objevit gastrointestinální potíže a snižuje se hladina hormonu tyroxinu v krvi. [15] Dlouhodobé užívání vysokých dávek zhoršuje vstřebávání vitamínu K se všemi důsledky a dochází ke snížení krevní srážlivosti. [6,13]

1.4 Denní doporučená dávka

Potřeba vitamínu E pro živočišný organismus je závislá na příjmu nenasycených mastných kyselin potravou. Obecně pro osoby s průměrným denním příjmem do 20 g polyenových mastných kyselin se doporučuje denní příjem 15 mg vitamínu E. Dalších 0,5 mg vitamínu se doporučuje na každý 1 g přijatých polyenových mastných kyselin. Hodnoty doporučených dávek vitamínu E se v jednotlivých zemích liší. Výživová doporučená dávka pro obyvatele ČR je 12,5 mg.den⁻¹. [2,16] U těhotných žen se doporučuje denní příjem vyšší o 2 mg a u kojících žen o 5 mg.

Potřebu vitamínu E pokrývají především rostlinné lipidy, zvláště oleje a margaríny, důležitým zdrojem jsou však i další potraviny rostlinného a živočišného původu, které sice obsahují méně vitamínu, ale konzumují se pravidelně a ve větším množství (maso, ovoce, listová zelenina). [3]

1.5 Potravinové doplňky s vitamínem E

Komerční vitaminové přípravky často obsahují estery α -tokoferolu (acetát nebo hydrogensukcinát), které jsou stálejší vůči oxidaci ve srovnání s volným α -tokoferolem. Esterifikací 6-hydroxyskupiny však vznikají biologicky inaktivní sloučeniny, které se ale působením nespecifických *esteras* rychle hydrolyzují na biologicky aktivní α -tokoferol. [3]

2 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je analytická fyzikálně-chemická metoda sloužící k dělení směsí látek, k izolaci a částečnému popisu oddělovaných látek, z nichž některé se mohou objevit nečekaně nebo jejich přítomnost ve směsi nemusí být předem známa.

V chromatografii se oddělované látky rozdělují mezi dvě fáze. Jedna z fází je nepohyblivá a má velký povrch nebo objem, druhá je fluidní a prochází nepohyblivou vrstvou nebo podél ní. K přechodu hmoty mezi pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární) fází dochází proto, že molekuly ze směsi se adsorbují na povrchu částic nebo v pórech, popř. přecházejí do vrstvy kapaliny ulpívající na povrchu nebo uvnitř pórů. Dělení složek vzorku je založeno na tom, že rychlost pohybu jednotlivých rozpuštěných molekul kolonou nebo tenkou vrstvou sorbentu je přímo závislá na rozdělování těchto molekul mezi mobilní a stacionární fázi. Rozdělovací konstanta každé složky určuje její obsah v mobilní fázi v kterékoliv době a tedy i celkový čas, po který tato složka setrvává ve stacionární fázi. Ten pak určuje zadržení nebo zpomalení pohybu rozpuštěné látky. Jestliže se složky dělí, vycházejí z kolony v různém časovém intervalu. Široký výběr materiálů pro mobilní i stacionární fázi umožňuje dělení látek, které se jen velmi málo od sebe liší ve fyzikálních i chemických vlastnostech. [17]

2.1 Rozdělení chromatografických metod

Podle stacionární fáze

- **sloupcová chromatografie** (kolonová chromatografie, CC, Column Chromatography) - stacionární fáze je v koloně
- **papírová chromatografie** (PP, Paper Chromatography) - stacionární fáze je papír nebo upravená celulóza, popř. jiný materiál
- **chromatografie na tenké vrstvě** (TLC, Thin Layer Chromatography) - stacionární fáze je suspenze v podobě tenké vrstvy

Podle mobilní fáze

- **plynová chromatografie** (GC, Gas Chromatography) - mobilní fáze je plyn
- **fluidní chromatografie** - mobilní fáze je látka v nadkritickém stavu

- **plazmová chromatografie** - mobilní fáze je proud iontů
- **kapalinová chromatografie** (LC, Liquid Chromatography, HPLC – High Performance Liquid Chromatography, rozdělovací chromatografie) - mobilní fáze je kapalina

Rozdělení chromatografie podle podmínek

- **izokratická chromatografie** - konstantní podmínky
- **gradientová chromatografie** - mění se podmínky, např. teplota nebo složení mobilní fáze [18]

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie - HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. [19] Zkratka HPLC je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky, a to „High Performance Liquid Chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „High Pressure Liquid Chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). [20] Vysoké účinnosti a rychlosti se u této metody dosahuje použitím kolon plněných náplněmi s velmi jemnými částicemi o velikosti 3 až 10 μm a poměrně velkých průtoků mobilní fáze, což však vyžaduje použití vysokotlakých čerpadel a takové konstrukce celého přístroje, která odolává tlakům od 30 až do 60 MPa. [21]

Metoda HPLC

- Umožňuje analyzovat látky o relativních molekulových hmotnostech od několika desítek do několika set tisíc.
- Významnou výhodou je velká rychlost analýzy a možnost automatického vyhodnocení naměřených dat.
- V současnosti jsou k dispozici různé druhy HPLC kolon vhodné pro nejrozmanitější účely.
- Moderní detekční systémy vynikají vysokou citlivostí a možností dosáhnout nízkých mezí detekce a mezí stanovitelnosti.

- Vedle tradičních analytických aplikací může být HPLC použita k čištění a preparaci složek ve směsích.

Základní aplikace metody HPLC

- Separace a identifikace látek ve směsích
- Kvantitativní analýza látek ve směsích
- Kontrola čistoty preparátů
- Kontrola surovin, výrobních meziproductů a produktů
- Kontrola životního prostředí (pesticidy v ekosystémech, potravinách, krmivech)
- Klinická a toxikologická analýza (hormony, léčiva, metabolity v tělních tekutinách)
- Kontrola potravinářských produktů
- Biologické a biochemické aplikace (analýza bílkovin a nukleových kyselin)
- Zemědělské aplikace (sledování migrace herbicidů v půdě) [22]

Separční mechanismy u HPLC

Gelová permeační chromatografie (GPC, Gel Permeation Chromatography) využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti.

Rozdělovací chromatografie (LLC, Liquid-Liquid Chromatography) využívá rozdílné rozpustnosti molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami.

Adsorpční chromatografie (LSC, Liquid-Solid Chromatography) využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry.

Iontově výměnná chromatografie (IEC, Ion-Exchange Chromatography) využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů na povrchu iontového měniče.

2.3 Základní pojmy

Retenční objem je objem mobilní fáze, který musí projít kolonou, aby se příslušný analyt dostal od počátku ke konci separační kolony.

Retenční čas je celkový čas, který příslušný analyt stráví v separační koloně.

Mrtvý objem kolony je objem eluentu, který musí projít kolonou, aby se nezadržovaný analyt dostal od počátku ke konci kolony.

Mrtvý čas kolony je retenční čas analytu, který není v koloně zadržován, tj. analytu, který se pohybuje kolonou stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

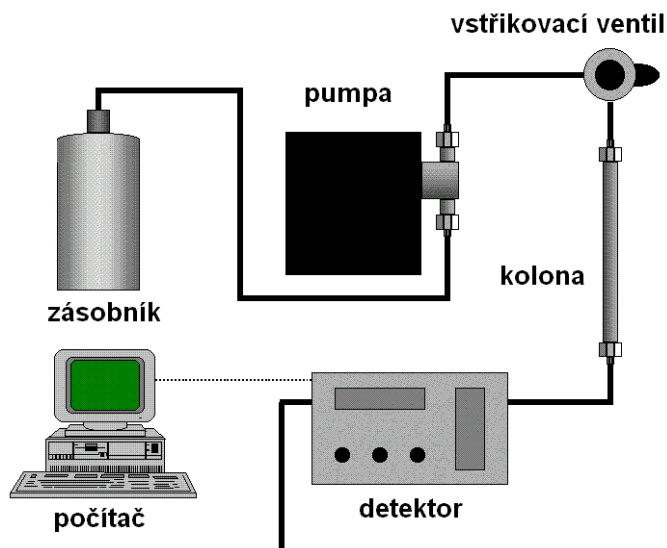
Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví v koloně. [23]

2.4 Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

- Zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze – zásobník, vysokotlaké čerpadlo
- Zařízení pro dávkování vzorku
- Zařízení pro separaci látek – chromatografická kolona, termostat kolony
- Zařízení pro detekci látek, záznam a zpracování dat

Kapalinový chromatograf může mít řadu obměn, některé komponenty lze vyřadit nebo naopak přidat. [24]



Obrázek č.1: Možnost uspořádání kapalinového chromatografu

2.4.1 Zásobník mobilní fáze

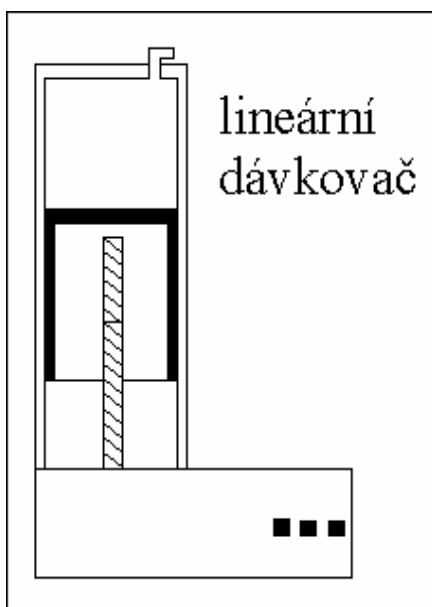
Mobilní fáze (zpravidla směsi organických rozpouštědel nebo vodné roztoky pufrů) se před použitím filtrují za účelem odstranění nečistot a odplyňují, např. s použitím ultrazvukové lázně. Do systému HPLC jsou čerpány nejčastěji za skleněných lahví. Do lahve zasahuje čerpací hadička opatřená často skleněnou fritou. [25]

2.4.2 Čerpadlo mobilní fáze

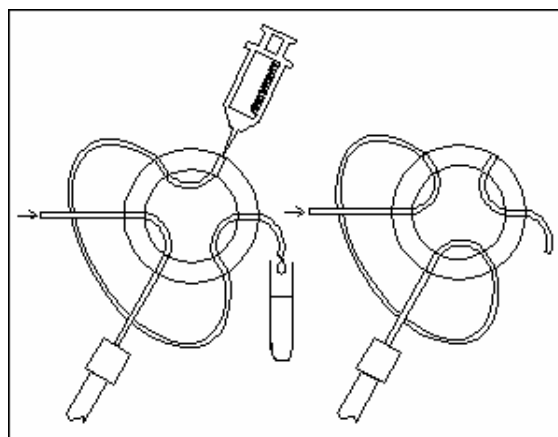
Moderní instrumentace umožňuje pracovat s tlaky až 60 MPa. Důležitá je vysoká přesnost a reprodukovatelnost v celé škále pracovních tlaků. Čerpadla bývají dělena na pulzní a bezpulzní, používají se pístová, membránová nebo pístově membránová. Materiálem pro výrobu je nejčastěji nerezová ocel, titan a keramika. [25] Nejdokonalejší je čerpadlo s lineárním posunem pístu (injekční čerpadlo). Eluent se rovnoměrnou rychlostí vytlačuje z válcové nádoby, která je současně tlakovým zásobníkem kapaliny. Tento systém umožňuje lehce měnit objemovou rychlost mobilní fáze (rychlostní gradient) a zaručuje vysoký stupeň reprodukovatelnosti nastavených parametrů. [26]

2.4.3 Dávkovače vzorku

Vzorky určené k separaci v kapalinovém chromatografu se rozpouštějí v mobilních fázích nebo v jiném vhodném rozpouštědle a dávkují se do zařízení vysokotlakými mikrostříkačkami či dávkovacími kohouty. Nejvhodnější je vzorek dávkovat přímo na vstup kolony. Dávkovací ventily se přednostně používají na reprodukovatelné dávkování většího počtu vzorků, na dávkování větších objemů a v takových systémech, kde je třeba dávkovat vzorek do tlaků vyšších než 3 MPa. Změna dávkovaného objemu vzorku se provede výměnou dávkovací kapiláry s volitelným objemem. [26]



Obrázek č.2: Lineární dávkovač



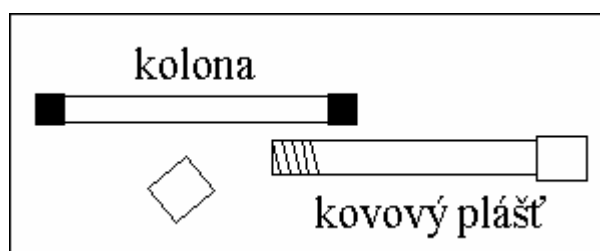
Obrázek č.3: Dávkovací kohouty

2.4.4 Kolony

Z konstrukčního hlediska chromatografickou kolonu tvoří trubice z vhodného materiálu, uzavřená na obou koncích uzávěry tak, aby po naplnění kolony zůstaly minimálně nevyplněné objemy. Součástí koncovky je vhodný filtr, který zabraňuje vyplavování částic náplně do detektoru. Koncovky kolony udržují stacionární fázi v koloně a přípojky jsou potřebné pro připojení dávkovače a detektoru ke koloně a pro spojování kolon.

Komerční přístroje na kapalinovou chromatografii mají obvykle dva samostatně temperované okruhy, termostat kolonového a dávkovacího prostoru a termostat detektoru. Dva samostatné okruhy jsou proto, aby bylo možné lépe splnit náročné požadavky na stabilitu teploty detektorů. [26]

Materiálem chromatografických kolon je většinou antikorozi ocel nebo speciálně tvrzené borosilikátové sklo, lze použít i kombinaci obou materiálů. Materiály pro plnění kolon jsou především založeny na anorganické matici (silikagel, oxid hlinitý, pórovité sklo), na níž mohou být chemicky vázány nebo zakotveny různé stacionární fáze, méně často se využívá organických gelů různé struktury, které mohou být rovněž chemicky modifikovány. Charakter stacionární fáze závisí na chromatografickém systému. V HPLC se často vyskytují pojmy „normální fáze“ a „reverzní fáze“. U normálních fází jsou funkční skupiny stacionární fáze polární, mobilní fází bývá nepolární rozpouštědlo (hexan). Chromatografie na tzv. systémech s obrácenými fázemi (RP-Reversed Phase) používá chemicky vázanou nepolární stacionární a polární mobilní fázi. [25]



Obrázek č.4: Chromatografická kolona

2.4.5 Detektory

Chromatografický detektor je zařízení na indikování přítomnosti vzorku nebo na kvantitativní sledování její koncentrace v eluátu. Detektor v podstatě sleduje vhodným snímačem jednu nebo současně několik vlastností eluátu a převádí jejich změny na

elektrické signály, které je možné zaznamenat zvoleným způsobem. V některých případech detektor určuje i vybrané vlastnosti eluovaného vzorku (molární hmotnost, absorpční spektrum).

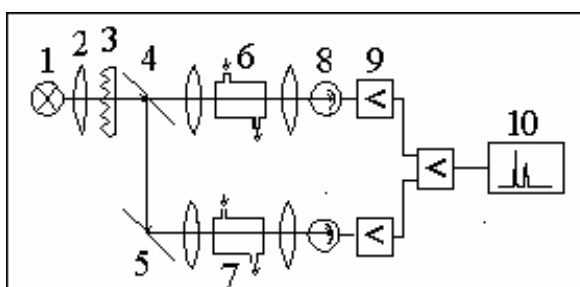
Základní kritéria výběru detektoru:

- specifická (pracují v ultrafialové, viditelné nebo infračervené oblasti spektra)
- snášlivost (kompatibilita s mobilní fází a kapalinovým programem)
- destruktivnost.

Tato kritéria do určité míry určuje systém rozdělovací látka a eluent. Často však chromatografický systém umožňuje použít více typů detektorů. [26]

▪ Fotometrické detektory (UV, VIS)

Jedná se o nejběžněji používané detektory umožňující sledovat absorbanci látek vystupujících z chromatografické kolony. Přes stěnu kyvety prochází světelný paprsek přicházející ze zdroje přes čočku a štěrbinu. Typ světelného zdroje závisí na sledovaném oboru vlnových délek, pro ultrafialovou oblast (200 nm – 350 nm) se používá deuteriová výbojka, pro oblast viditelného záření (350 nm – 700 nm) halogenová zářivka. Za měrnou celou je umístěna disperzní mřížka a vhodný detektor dopadajícího záření. Fotometrický detektor pracující v ultrafialové oblasti je pro organické látky prakticky univerzální. [19, 27]

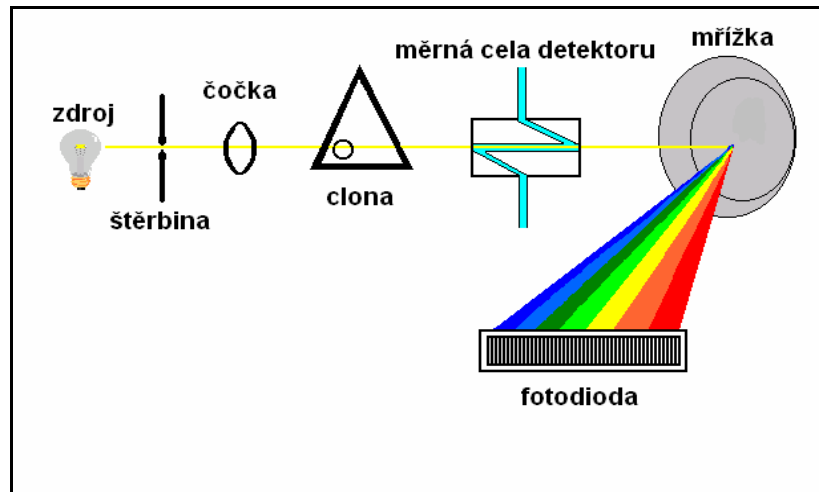


Obrázek č.5: Fotometrický detektor

- | | |
|-------------------------|-------------------|
| 1 světelný zdroj | 6 měrná cela |
| 2 čočka | 7 referentní cela |
| 3 monochromátor | 8 fotonásobič |
| 4 polopropustné zrcadlo | 9 zesilovač |
| 5 zrcadlo | 10 zapisovač |

- *Detektor diodového pole (DAD, Photodiode-Array)*

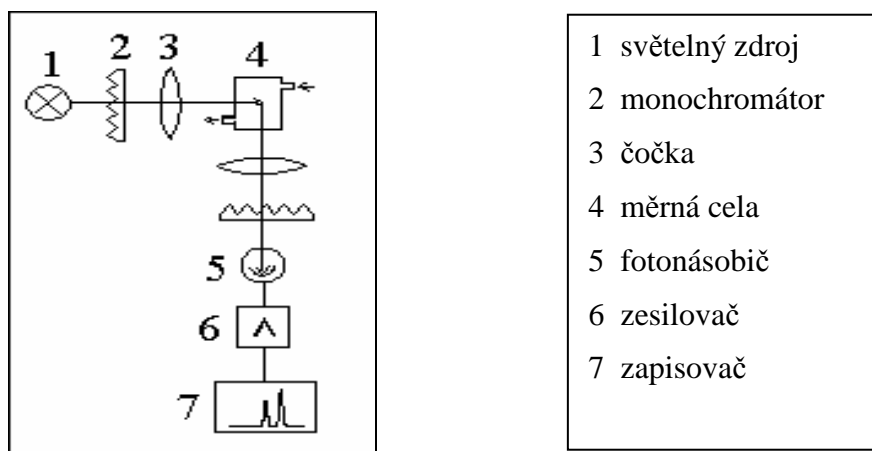
Tyto detektory umožňují s pomocí řídicí jednotky detekci látky při jakékoli zvolené vlnové délce, porovnávají snímaná spektra s knihovnou spekter a látku identifikují.



Obrázek č.6: Detektor s diodovým polem

- *Fluorimetrický detektor*

Jedná se o selektivní detektor s vysokou citlivostí. Při měření fluorescence se budící UV záření ze zdroje vede do průtokové cely, kde se absorbuje a vyzářené světelné kvantum o větší vlnové délce se měří fotonásobičem.



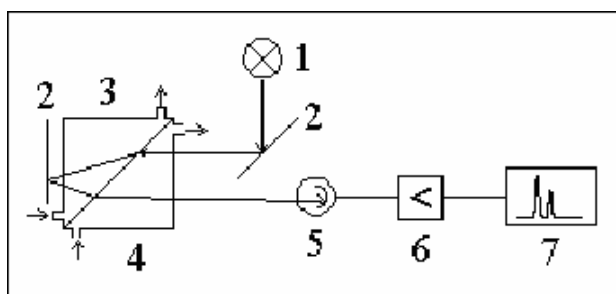
Obrázek č.7: Fluorimetrický detektor

- **Elektrochemický detektor**

Umožňuje stanovit velmi nízké koncentrace látek v eluentu v případě, že tyto látky jsou elektrochemicky aktivní (redukovatelné nebo oxidovatelné). Měří se proud protékající mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí. [25]

- **Refraktometrický detektor**

Založen na měření indexu lomu (celkový index lomu analyzu a rozpouštědla). Detektor je tím citlivější, čím větší je rozdíl mezi indexem lomu analytu a rozpouštědla. Významnou vlastností je zde univerzálnost, naopak nevýhodou je závislost indexu lomu na teplotě. [27]



Obrázek č.8: Refraktometrický detektor

- | | |
|-------------------|---------------|
| 1 zdroj světla | 5 fotonásobič |
| 2 zrcadlo | 6 zesilovač |
| 3 měrná cela | 7 zapisovač |
| 4 referentní cela | |

- **Hmotnostní detekce (LC/MS)**

Jedná se o možnost přímé identifikace jednotlivých separovaných látek vycházejících z kolony na základě získaných hmotnostních spekter. [19]

2.4.6 Stacionární a mobilní fáze

Stacionární fáze je látka, na které probíhají chromatografické separace směsí unášených mobilní fází. Stacionární fáze jsou spolu s detektory nejdůležitějšími složkami chromatografického systému a jejich výběru na určitý experiment je třeba věnovat dostatečnou pozornost. Úloha mobilní fáze a její důležitost se mění v závislosti na typu kapalinové chromatografie. V adsorpční kapalinové chromatografii interakce mobilní fáze

s adsorbentem a s rozpuštěnými látkami přímo určuje rozsah chromatografického rozdělování. Od mobilních fází se vyžaduje, aby rozpouštěly vzorek, byly kompatibilní s použitelným detektorem a smáčely stacionární fázi. Dále by měly mít minimální viskozitu, jedovatost, hořlavost, dostatečnou stabilitu v porovnání s vnějšími vlivy (oxidace, fotolýza), průměrnou cenu a měly by být běžně dostupné.

Adsorbenty se často pokrývají různými látkami tak, aby se upravily vlastnosti jejich povrchu. Stacionární fáze je možno klasifikovat z vícero hledisek. Podle složení jde o anorganické, organické a smíšené materiály. Z hlediska použití jsou rozdělovány na adsorbenty pro adsorpční kapalinovou chromatografii (LSC), nosiče pro rozdělovací chromatografii (LLC), gely pro gelovou permeační chromatografii (GPC) a ionexy na ionexovou chromatografii (IEC). Nejpoužívanějšími adsorbenty na LSC jsou celopórovité silikagely a skla s chemickým složením a aluminy. [26]

2.4.7 Vyhodnocení

Nejdříve je potřebné identifikovat jednotlivé píky chromatogramu, dešifrovat chromatografický záznam. A to buď chromatografickým způsobem, při kterém využíváme chromatografické rozdělování a jeho obměny, anebo nechromatografickými postupy (jinými fyzikálně-chemickými nebo chemickými metodami), kterými se analyzují získané frakce nebo i celé východiskové vzorky. Následujícím krokem je kvalifikace analýzy, přeměna výsledků na numerické údaje a jejich matematické zpracování. Ve většině chromatografických technik je teoreticky možné rozdělit všechny složky vzorku a zaregistrovat je v podobě homogenních píků. Identifikací látky se rozumí postup, který umožní jednoznačné přiřazení homogenního píku k jedné v literatuře popsané látce, jejíž struktura nemusí být známa. Chromatogram zkoumané látky získaný za definovaných podmínek se vyznačuje těmito retenčními charakteristikami: polohou píku v chromatogramu, šířkou píku na nulové linii anebo v polovině jeho výšky, velikostí plochy píku, stupněm rozdělení nebo stupněm překrytí a tvarem píku. Uvedené retenční charakteristiky je možné využít na chromatografické identifikace. Chromatografie je ale především separační metoda a retenční charakteristiky na spolehlivou identifikaci vždy nestačí. [26]

3 STANOVENÍ VITAMÍNU E METODOU HPLC

3.1 Stanovení vitaminu E v krmných směsích a potravinách

3.1.1 Princip

Alkalická hydrolyza hydroxidem draselným byla provedena na rotační třepačce RT01 (BMF, ČR). Hexanový extrakt byl odpařen na rotační vakuové odparce RVO A400 (Ingot, ČR). K zakoncentrování extraktů se používal koncentrátor vzorků Termovap (Ecom, ČR). Odstředění extraktu bylo provedeno na laboratorní odstředivce Herme Z 230 MR (Hermle, ČR). Všechna měření byla provedena na kapalinovém chromatografu (Waters, USA), který se skládal z vysokotlakého čerpadla W515, fluorimetrického detektoru W487 a datastanice PC Compaq. Byly použity kolony NovaPak C18, 4 μm (3,9 x 150 mm) a NovaPak Silica 4 μm (2,1 x 150 mm, Waters, USA).

3.1.2 Chemikálie a vzorky

Byly použity methanol, tetrahydrofuran a cyklohexan čistoty HPLC grade (T.J.Baker, USA) a absolutní ethanol pro UV (Merck, SRN). Základní roztoky tokoferolů a tokotrienolů o přibližné koncentraci 500 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním α -, β -, γ -, δ -tokoferolu a α -, β -, γ -, δ -tokotrienolu (Calbiochem Chemicals, Francie) s deklarovaným obsahem v hexanu. Byly analyzovány suroviny pro výrobu krmiv a krmné směsi odebrané v rámci státního odborného dozoru a dále komerčně dostupné potraviny (oleje, obiloviny, sušené mléko a další produkty).

3.1.3 Pracovní postup

Všechny tuhé vzorky byly upraveny homogenizací a mletím na částice o velikosti 0,5 mm. Mletí bylo provedeno tak, aby se vzorek nezahříval. K 80 g tuhého zkušební vzorku (nebo 2 g oleje) se přidalo 320 ml roztoku ethanol-voda (1:2), 90 ml 60% roztoku hydroxidu draselného, 750 mg kyseliny L-askorbové, 500 mg hydrochinonu a 500 mg EDTA. Směs se hydrolyzovala v 1000 ml kónické baňce na rotační laboratorní třepačce za laboratorní teploty přes noc. Po extrakci se odpipetovalo 50 ml hydrolyzátu, který se extrahoval 4x 80 ml hexanu. Spojený hexanový extrakt se vysušil přefiltrováním přes vrstvu bezvodého síranu sodného a odpařil na rotační vakuové odparce při 50°C na objem

10 ml, který byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn hexanem. Z tohoto extraktu byl odpipetován objem 5 ml, který se odpařil pod proudem dusíku při 45°C do sucha a odparek se rozpustil v 5 ml methanolu. Takto připravený extrakt se použil přímo k měření vitamínu E.

3.1.4 Chromatografické podmínky

- Kolona: NovaPak C18, 150 x 3,9 mm, 4 μm
- Průtok mobilní fáze: 1,0 ml.min⁻¹
- Mobilní fáze: methanol-voda (98:2)
- Teplota kolony: 30°C
- Objem dávkovací smyčky: 10 μl
- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 292 nm, emisní: 330 nm [28]

3.2 Stanovení vitamínu E v krmivech a prefixech doplňkových látek

3.2.1 Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní alkalickým hydroxidem (KOH) a vitamín E se extrahuje do organického rozpouštědla hexanu. Extrakt se odpaří do sucha a odparek se rozpustí v methanolu, je-li nutné, naředí se na požadovanou koncentraci. Vitamin E se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách: excitační: 295 nm a emisní: 330 nm.

3.2.2 Chemikálie a vzorky

- Ethanol, denaturovaný 1% hexanem
- Kyselina askorbová
- Hydrochinon pevný
- KOH, ethanolický roztok (35% ethanolu) 200 g.l⁻¹
- Dusík, žárovkárenský, prostý kyselých látek a plynů
- Nasycený roztok NaCl v 35% ethanolu
- Hexan

3.2.3 Pracovní postup

Vitaminu E se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV zářením, je citlivý na oxidační a kyselé látky. Při zpracování vzorku je třeba se vyhnout přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Pokud možno, vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku probíhá těsně před jeho zmýdelněním a dalším zpracováním, aby se zabránilo případným ztrátám.

Podle obsahu vitaminu E se do kulaté baňky s plochým dnem na 250 nebo 500 ml se zábrusem navázilo 5 g (premixy doplňkových látek) nebo 15 až 20 g (krmné směsi) zkušební vzorku a ta se zalila 25 ml ethanolu. Postupně bylo přidáno 750 mg kyseliny askorbové, 500 mg pevného hydrochinonu a 75 ml roztoku hydroxidu draselného. Na baňku se nasadil zpětný chladič a po 5 minutové deareaci dusíkem se baňka ponořila do vodní lázně a obsah baňky byl zmýdelňován 30 minut (premixy doplňkových látek) nebo 60 minut (krmné směsi, čisté látky). Po ukončení zmýdelnění byl zpětný chladič opláchnut 30 ml 35% ethanolu, bylo přidáno 34 ml vody a baňka byla ochlazena na laboratorní teplotu.

Do dělicí nálevky na 500 ml bylo přidáno 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a zmýdelněný roztok byl převeden do dělicí nálevky tak, že pevný podíl zůstal v baňce. Pevný podíl byl vypláchnut 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a kapalina byla převedena do dělicí nálevky. K pevnému podílu ve zmýdelňovací baňce bylo přidáno 60 ml hexanu a vzorek byl promíchán. Po usazení sedliny se hexanový podíl převedl do dělicí nálevky k vodno-ethanolické fázi, dělicí nálevka byla uzavřena a protřepána po dobu 30 s. Obě fáze se nechaly asi 2-5 minut rozdělit. Extrakce vodné fáze s hexanem byla provedena ještě dvakrát a to tak, že byla vodná fáze extrahována nejprve s 50 ml hexanu a poté opět s 50 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází se hexanové extrakty spojily. V případě obsahu tuku nad 30 g.kg^{-1} se extrakce opakuje 4krát, pro obsahy tuku nad 70 g.kg^{-1} 5krát. Spojené extrakty byly propláchnuty vodou.

3.2.4 Chromatografické metody

- Kolona: C18 – NovaPak 4 μm , 150 x 3,9 mm (Waters) nebo
C18 – NovaPak 4 μm , 250 x 4,6 mm (Waters)
- Eluční roztok: methanol-voda (98:2)

- Průtok mobilní fáze: 1,0 ml.min⁻¹
- Teplota kolony: 30°C
- Objem dávkovací smyčky: fluorescenční detektor 5 µl, UV-detektor 25 µl
- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 295 nm, emisní: 330 nm
- Vlnová délka při UV detekci: 325 nm [29]

3.3 Stanovení vitamínu E v margarínu a tucích

3.3.1 Princip

Tokoferoly byly extrahovány přímo hexanem za přítomnosti bezvodého síranu hořečnatého k odstranění vody. Separace proběhla na normální fázi (silikagel) s fluorescenční detekcí. Tokoferoly byly extrahovány rozpuštěním tuku v hexanu na ultrazvuku. Po rozpuštění tuku byl přidán bezvodý síran hořečnatý a vzorek se nechal 2 hodiny stát. Po filtraci a převedení extraktu do definovaného objemu a naředění se tokoferoly separovaly za následujících chromatografických podmínek:

- Kolona: LiChrosorb Si 60,5 mm, 250 x 4,6 mm
- Průtok mobilní fáze: 0,9 ml.min⁻¹
- Mobilní fáze: 0,9 % isopropanolu v hexanu
- Teplota kolony: 20°C
- Objem dávkovací smyčky: 20 µl
- Detekce: fluorescenční: excitační: 290 nm, emisní: 330 nm [30]

3.4 Stanovení vitamínu E ve zralých sýrech

Sýr použitý pro analýzu byl zakoupen v obchodní síti, jednalo se o Parmigiano-Reggiano (parmezán). Poté byl rozkrájen na menší části a uchován při 4°C ve vakuu až do stanovení.

3.4.1 Přístroje a zařízení

- Vířivka (Heidolph Reax Top)
- Termostatovaná vodní lázeň
- Dělicí nálevka (100 ml)
- Rotační odparka (Buchi 461)

- Centrifuga (ALC 4235 A)
- HPLC Shimadzu LC-10 AD
- Detektor UV-VIS Shimadzu SPD-6AV
- Nahrávací zařízení: Shimadzu C-R5A
- Kolona CS Spherisorb C 18, 250 mm ODS 10 μm
- Mikrodávkoč Hamilton (50 μl)

3.4.2 Chemikálie a vzorky

- Methanol (T.J.Baker)
- Ethanol (Carlo Erba)
- Petrolejový éter (T.J.Baker)
- NaCl (Merck)
- Vitamin C (Fluka)
- 50% KOH
- DL- α -tokoferol (SUPELCO)
- Dusík

Základní roztok byl vytvořen ze zásobního roztoku (1000 mg.l^{-1}) získaného rozpuštěním 100 g DL- α -tokoferolu ve 100 ml methanolu. Pracovní roztok byl získán postupným zředěním roztoku zásobního v methanolu.

Bylo analyzováno pětkrát osm roztoků o známé koncentraci obsahujících vzorek mezi 0,3 mg.kg^{-1} a 10 mg.kg^{-1} .

3.4.3 Chromatografické podmínky

- Průtok mobilní fáze: 1 ml.min^{-1}
- Mobilní fáze: methanol
- Teplota kolony: 20°C
- Objem nástřiku: 20 μl
- Retenční čas: 5 minut
- Vlnová délka: 294 nm

3.4.4 Zmýdelnění

Do zkumavky se 2 g rozdrobeného vzorku bylo přidáno 0,3 g vitamínu C a 5 ml destilované vody. Směs byla zahřata na 50°C a třepána po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 10 ml ethanolu a špetka NaCl. Směs byla 10 minut promíchávána a po přidavku 5 ml hydroxidu sodného byla umístěna do vodní lázně o 70°C na 30 minut pod proud dusíku.

3.4.5 Extrakce

Po ochlazení byl obsah baňky dvakrát propláchnut 5 ml destilované vody a následně 30 ml petrolejového éteru, který byl přilít nálevkou. Nálevka byla uzavřena a několikrát promíchána. Hydratační fáze byla odejmuta v předchozí baňce, zatímco éterická fáze byla umístěna do nové baňky. Extrakce proběhla dvakrát s 30 ml éteru. Éterické fáze byly sloučeny a převedeny do dělicí nálevky, šestkrát propláchnuty 50 ml vody a odebrány do baňky. Nálevka byla promyta 10 ml éteru. Poté byl materiál umístěn na odparku při 45°C do vysušení za částečného vakua (5 minut). Po ochlazení byl zbytek smíchán s 5 ml methanolu a po protřepání byl rozpuštěn a převeden do zkumavky. Poté proběhlo odstředění při 4000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. [31]

3.5 Stanovení vitamínu E v mateřském mléce

Příjem matek do studie byl proveden se souhlasem The Local Research Ethics Committee. Do studie bylo přijato dvacet matek s bohatou produkcí mléka, které porodily předčasně. Mléko bylo přivezeno do sterilních plastických nádob elektrickou pumpou, která se obvykle používá na novorozeneckém oddělení. Po sběru bylo mléko ihned zmrazeno a uloženo do mrazáku při -40°C až do analýzy. Analýza byla provedena za deset dnů.

3.5.1 Chemikálie a vzorky

- Hexan
- Pyrogallol
- Methanol
- KOH (Poole, UK)
- HCl (Poole, UK)
- α -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol a tokoferol acetát (Dorset, UK)
- Ultra čistá voda

Zásobní roztoky standardů δ -tokoferolu byly připraveny v ethanolu a uloženy na jeden týden při -20°C . Reprezentativní roztoky standardů δ -tokoferolu byly přichystány v den analýzy ze zásobních roztoků. Standardy ostatních tokoferolů byly připraveny stejným způsobem. Po rozmrazení byly vzorky mléka zahřáty na 38°C a zhomogenizovány pomocí ultrazvuku.

3.5.2 Metoda I

1 ml mléka byl smíchán s 10 μl standardu δ -tokoferolu. Byl přidán 1 ml methanolu obsahujícího 3% pyrogallol a 1 ml 10% hydroxidu draselného. Vzorky byly promíchány a vloženy do vodní lázně. Zmýdelnění probíhalo 30 minut při 70°C . Po prvních 15 minutách zmýdelňování byly zkumavky promíchány. Po ochlazení bylo upraveno pH na 2 a to 6 mol.l^{-1} kyselinou chlorovodíkovou. Poté byly přidány 4 ml hexanu. Zkumavky byly třikrát energicky míchány po dobu 20 s a mezi mícháním byly ochlazeny vložení do ledu. K oddělení emulze byly vzorky odstřeďovány při 1300 otáčkách 10 minut. Vrchní organická vrstva byla převedena do čisté nádoby z ohnivzdorného skla a odpařena pod mírným proudem dusíku na misce o teplotě 40°C . Hutná sraženina byla rozpuštěna v 0,5 ml směsi methanol-propan-2-ol (1:1) při teplotě 30°C .

3.5.3 Metoda II

1 ml mléka byl smíchán s 10 μl standardu δ -tokoferolu. K rozrušení mléčných tukových kuliček byl přidán 1 ml methanolu obsahujícího 2% pyrogallol. Zkumavky byly uloženy na 10 minut do ledu. Poté byly přidány 3 ml hexanu. Po extrakci hexanem následovala separace, odpaření a rekonstituce probíhající stejným způsobem jako v Metodě I.

K ochraně vitamínu E před možnou degradací během extrakce a zmýdelnění bylo užito pyrogallolu.

3.5.4 Chromatografický systém a podmínky

Pro experiment byl použit chromatograf pracující se systémem Waters zahrnujícím separační modul Alliance 2690 a 996 detektor diodového pole. Zpracování dat proběhlo pomocí Millennium software. Tokoferoly byly separovány na koloně Waters Symmetry C_{18} (3,9 x 150 mm) s předkolonou Waters Symmetry C_{18} (3,9 x 10 mm). Mobilní fází byl

acetonitril. Chromatografické podmínky byly následující: průtok mobilní fáze 1 ml.min⁻¹, objem dávkovací smyčky 25 µl, teplota kolony 45°C, vlnová délka v rozmezí 275-350 nm. [32]

3.6 Stanovení vitamínu E v kravském mléce

3.6.1 Princip

Roztok methanolu či ethanolu způsobil ve vzorcích mléka denuraci lipoproteinů. Alkalické zmýdelnění u testovaného materiálu eliminovalo tuky a uvolňovalo vitamin E ve formě nezmýdelnitelného vzorku, který byl postupně extrahován petrolejovým éterem.

3.6.2 Přístroje a zařízení

- Vířivka (Heidolph Reax Top)
- Termostatovaná vodní lázeň (GFL 1041)
- Dělicí nálevky (100 ml)
- Rotační odparka (Buchi 461)
- Centrifuga (ALC 4235 A)
- HPLC Shimadzu LC-10 AD
- Detektor UV-VIS Shimadzu SPD-6AV
- Nahrávací zařízení: Shimadzu C-R5A
- Kolona CS Spherisorb C18, 250 mm ODS 10 µm
- Mikrodávkač Hamilton (50 µl)

3.6.3 Chemikálie a vzorky

- Extra čistý petrolejový éter (T.J.Baker)
- 0,5% kyselina askorbová
- 50% KOH
- Čistý DL- α -tokoferol (SUPELCO)
- Methanol (T.J.Baker)
- Dusík nebo hélium

3.6.4 Chromatografické podmínky

- Průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹
- Mobilní fáze: methanol
- Teplota kolony: 25°C
- Objem dávkovací smyčky: 20 µl
- Retenční čas: 5 minut
- Vlnová délka: 294 nm

Zásobní roztok (1 mg.ml⁻¹) byl získán rozpuštěním 100 mg DL- α -tokoferolu ve 100 ml methanolu. Pracovní roztoky (0,3, 0,5, 0,75, 1, 2 mg.ml⁻¹) byly vytvořeny postupným ředěním zásobního roztoku methanolem.

Vzorky mléka byly po homogenizaci rozděleny na 10 alikvotních podílů a uchovány v polyethylenové tubě a zmrazeny na -20°C až do analýzy.

3.6.5 Zmýdelnění

Vzorky mléka o teplotě místnosti byly promíchány a byly rozděleny po 10 g do odměrné baňky. Dále bylo přidáno 10 ml roztoku kyseliny askorbové a odměrná baňka byla vložena do vodní lázně o teplotě 80°C za současného pročištění héliem. V bodě varu byly přidány 2 ml roztoku hydroxidu draselného. Po 20 minutách byla odměrná baňka vyjmuta z vodní lázně a přemístěna na tmavé místo až do vychladnutí.

3.6.6 Extrakce

Po ochlazení byl obsah baňky nalit do dělicí nálevky a dvakrát propláchnut 5 ml vody a následně 30 ml éteru. Nálevka byla uzavřena a několikrát promíchána. Hydratační fáze byla odejmuta do jedné odměrné baňky a éterická fáze byla umístěna do druhé. Extrakce proběhla dvakrát s 30 ml éteru. Éterické fáze byly sloučeny a převedeny do dělicí nálevky, šestkrát propláchnuty 50 ml vody a odebrány do baňky. Nálevka byla promyta 10 ml éteru. Poté byl testovaný vzorek umístěn na odparku a při 45°C byl odpařen do sucha. Po vychlazení byl vzorek smíchán s 5ml methanolu a po protřepání byl rozpuštěn a převeden do zkumavky. Poté proběhlo odstředění při 4000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut. [33]

3.7 Stanovení vitamínu E v hovězí svalovině

3.7.1 Chemikálie a vzorky

- Ethanol (Fisher Scientific, Pittsburgh)
- Tetrahydrofuran (Fisher Scientific, Pittsburgh)
- Methanol (Fisher Scientific, Pittsburgh)
- Izooktan (Fisher Scientific, Pittsburgh)
- Kyselina askorbová (Sigma Chemical, Saint Luis)
- KOH (Sigma Chemical, Saint Luis)
- DL- α -tokoferol (Sigma Chemical, Saint Luis)
- Vysoce čistý dusík (Liquid Carbonic, Oak Brook)

Vzorky svalů byly shromážděny od 51 kusů dobytka původem z Holandska a po 200 g kusech vakuově zabalených byly dopraveny do laboratoře.

Roztoky byly připravovány každý den a byly složeny z 11% hydroxidu draselného a směsi ethanolu a deionizované destilované vody. Hydroxid draselný byl rozpuštěn v destilované vodě před přidáním ethanolu.

3.7.2 Zmýdelnění a extrakce

Ihned po obdržení vzorků svalů byl 1 g vzorku vložen do zkumavky o rozměrech 20 x 150 mm. Do každé zkumavky bylo přidáno 250 ml kyseliny askorbové a 7,3 ml předem připraveného roztoku. Přídavek kyseliny askorbové před zmýdelněním byl nutný k ochraně α -tokoferolu před zničením alkalickým roztokem. Zkumavky byly inkubovány při 80°C ve vodní lázni po dobu 15 minut. Poté byly zkumavky zchlazeny a byly přidány 4 ml izooktanu. Následovaly 2 minuty ve vířivce. Po oddělení fází byl alikvotní podíl horní vrstvy přesunut do autosampleru. Dávkovací objem byl 30 μ l.

3.7.3 Chromatografické podmínky

- Průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹
- Mobilní fáze: 96 % izooktan : 4 % tetrahydrofuran
- Teplota kolony: 15°C

- Objem nástřiku: 30 μl
- Retenční čas: 5,2 minut
- Vlnová délka při fluorescenční detekci: excitační: 296 nm, emisní: 325 nm [34]

3.8 Stanovení vitamínu E v rostlinných olejích

Pro stanovení byly použity vzorky oleje z keře *Hippophae rhamnoides*, oleje palmového, kukuřičného, sojového a světlicového. Oleje byly skladovány při chladírenských teplotách a chráněny před světlem až do analýzy. Poté byly vzorky zředěny hexanem v poměru 1:50 a zfiltrány přes 0,22 μm GV membránu.

3.8.1 Chromatografický systém a podmínky

Pro detekci byl použit systém WATERS_ALLIANCE HPLC s autosamplérem WATERS 2690 a detektorem UV 2487 působícím v intervalu 190-700 nm. Vyhodnocovacím softwarem byl MILLENIUM, kolona Ultrabase C8 Symmetry (150 x 3,9 mm, 5 μm). Objem nástřiku byl 100 μl . Mobilní fáze byl složena ze 45 % methanolu, 45 % acetonitrilu a 10 % vody. [35]

3.9 Stanovení vitamínu E v lidské plazmě

3.9.1 Chemikálie a vzorky

- α -tokoferol, čistota 95% (Sigma Chemical, Saint Luis, USA)
- Methanol (Merck, Darmstadt, SRN)
- Acetonitril (Merck, Darmstadt, SRN)
- Tetrahydrofuran (Merck, Darmstadt, SRN)
- Deionizovaná voda (Millipore, Milford, USA)
- Dusík

3.9.2 Chromatografický systém a podmínky

HPLC systém (Waters 2690 Separation Module) byl sestaven z pumpy Waters 600E, mikrodávkovače Waters Ultra WISP 715 a Waters 996 detektor diodového pole s rozmezím vlnové délky 200–400 nm (Milford, USA). Vitamin E byl separován na koloně

LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 μm ; Merck, Darmstadt, SRN), s mobilní fází methanol - acetonitril - tetrahydrofuran (75:20:5) o průtoku 1,2 ml.min⁻¹.

3.9.3 Příprava vzorku

Vzorky lidské plazmy byly zkoncentrovány od 0,25 do 5 $\mu\text{m}.\text{ml}^{-1}$. 100 μl plazmy bylo smícháno s 400 μl 60% methanolu a inkubováno 10 minut při 4°C. Poté proběhlo odstředění při 12 000 otáčkách za minutu po dobu 8 minut. Čistá fáze byla převedena do polypropylenové tuby a odpařena do sucha pod dusíkem. Suché extrakty byly rozpuštěny ve 100 μl methanolu.

Vitamin E v plazmě byl extrahován následujícím způsobem: ke 100 μl plazmy bylo přidáno 100 μl ethanolu a bylo extrahováno 600 μl chloroformu. Extrakt byl 5 minut protřepáván

a odstředěn. Získaná organická vrstva byla odpařena do sucha pod dusíkem. Vysušené extrakty byly poté rozpuštěny ve 100 μl methanolu.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo teoreticky zpracovat fyziologii vitamínu E, popsat základy kapalinové chromatografie a navrhnout možnosti stanovení vitamínu E metodou HPLC dle původu potraviny.

Jako vitamin E je označováno osm derivátů tokolu nebo tokotrienolu lišících se od sebe počtem methylových skupin. Vitamin E je jedním z nejvýznamnějších antioxidantů, rozrušuje řetězové reakce volných radikálů v membránách, lipidech a lipoproteinech a napomáhá ochraně LDL před oxidačním působením. Také se účastní opravy porušených membrán, snižuje opotřebení nervové tkáně a zabraňuje tvorbě krevních sraženin. K jeho ztrátám dochází zejména při rafinaci olejů, vaření, pečení, sušení a mrazírenském uchovávání potravin. Zdrojem vitamínu E jsou především rostlinné oleje, jádra ořechů, kukuřice, hrášek, ovesná mouka, slunečnicová semínka a listová zelenina, dále vejce, máslo, mléko, králičí a vepřové maso, játra a ostatní vnitřnosti. Nedostatek vitamínu způsobuje změny v reprodukčním systému, svalstvu, nervové či cévní soustavě, u dětí byla pozorována anémie. Při dlouhodobém užívání vysokých dávek vitamínu E dochází ke snížení krevní srážlivosti. Výživová doporučená dávka pro obyvatele ČR je $12,5 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$. U těhotných žen se doporučuje denní příjem vyšší o 2 mg a u kojících žen o 5 mg.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie HPLC je analytická, fyzikálně-chemická separační metoda. Vysoké účinnosti a rychlosti dělení látek je zde dosahováno použitím kvalitních kolon plněných velmi jemnými sorbenty a relativně vysokých průtoků mobilních fází dávkovaných vysokotlakými čerpadly. Přístroj, na kterém se HPLC analýza provádí se nazývá kapalinový chromatograf. Jeho základními prvky jsou zařízení pro uchovávání a transport mobilní fáze (zásobník, čerpadlo), dávkování vzorku, separaci látek (chromatografická kolona), detekci látek a zpracování dat. Mobilní fáze jsou do systému čerpány nejčastěji ze skleněných lahví. Čerpadla, která zajišťují tok mobilní fáze, musí být z velmi odolných materiálů. Vzorky jsou do zařízení dávkovány vysokotlakými mikrostříkačkami či dávkovacími kohouty. Separací kolony odolávající vysokému tlaku mobilní fáze jsou naplněny vhodnou stacionární fází. Nejčastěji používanými typy detektorů jsou fotometrické, fluorimetrické, hmotnostní a detektory diodového pole.

Při stanovení vitamínu E v krmných směsích a potravinách byla jako mobilní fáze použita směs methanolu a vody v poměru 98:2 a průtoku $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Fluorescenční detekce proběhla při vlnové délce excitační 292 nm a emisní 330 nm.

Před vlastním stanovením v krmivech a prefixech doplňkových látek bylo provedeno zmýdelnění a extrakce vitamínu E do organického rozpouštědla. Mobilní fází byla směs methanolu a vody v poměru 98:2. Byla užita UV detekce při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekce při vlnové délce excitační 295 nm a emisní 330 nm.

Separace vitamínu E v tucích a margarínu proběhla na normální fázi s fluorescenční detekcí při vlnové délce excitační 290 nm a emisní 330 nm a za použití mobilní fáze 0,9 % isopropanolu v hexanu a průtoku $0,9 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

U stanovení vitamínu E ve zralém sýru Parmigiano-Reggiano byl mobilní fází methanol. Detekce byla provedena při vlnové délce 294 nm. Retenční čas byl 5 minut.

Při separaci v mateřském mléce byl použit acetonitril jako mobilní fáze s průtokem $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, v mléce kravském pak methanol se stejným průtokem. Detekce byla provedena v rozmezí vlnové délky 275-350 nm u mateřského mléka, u kravského byla vlnová délka 294 nm. Retenční čas byl 5 minut.

Dále proběhlo stanovení vitamínu E v hovězí svalovině. Zde byla použita jako mobilní fáze směs izooktanu a tetrahydrofuranu. Fluorescenční detekce proběhla při vlnové délce excitační 296 nm a emisní 325 nm. Retenční čas byl 5,2 minuty.

Z rostlinných olejů byl vitamin E separován za použití mobilní fáze složené z methanolu, acetonitrilu, vody a detekce byla při vlnové délce 190 až 700 nm.

Stanovení vitamínu E proběhlo i v lidské plazmě. Mobilní fáze byla složena z methanolu, acetonitrilu a tetrahydrofuranu s rychlostí průtoku $1,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Použit byl detektor diodového pole s rozmezím vlnové délky 200 – 400 nm.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BRIGERIUS-FLOHÉ, R., TRABER M.G. *Vitamin E: function and metabolism*, FASEB J., vol. 13, 1999, p. 1145-1155
- [2] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*, UTB Academica centrum Zlín, Zlín 2006
- [3] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 1999
- [4] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, SNTL, Praha 1983
- [5] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, Grada Publishing, Praha 2004
- [6] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*, VVŠ PV Vyškov, Vyškov 2000
- [7] *Reference Values for Nutrient Intake*, 1st engl. ed. Bonn: DGE, 2002, p. 216
- [8] TRAN, T.L. *Antioxidant supplements to prevent heart disease: real hope or empty type?*, Postgraduate Medicine, vol. 190, 2001, p. 109-114
- [9] Dostupné na <http://cs.wikipedia.org/wiki/Autoimunita>
- [10] BUŇKA, F., NOVÁK, V., KADIDLOVÁ, H. *Ekonomika výživy a výživová politika I*, UTB Academica centrum Zlín, 2006
- [11] Dostupné na <http://en.wikipedia.org/wiki/Tocopherol>
- [12] BRÁZDOVÁ, Z. *Výživa člověka*, VVŠ PV Vyškov, Vyškov 1995
- [13] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*, H+H, Jinočany 2002
- [14] DOSTÁL, J., KAPLAN, P. *Lékařská biochemie II*, Masarykova univerzita v Brně, Brno 2003
- [15] GASSMANN, B. *Dietary Reference Intakes, Report 3: Vitamine C und E, Selen, Carotinoide*, Ernährungs-Umschau, vol. 47, 2000, p. 265-270
- [16] ŠTIKOVÁ, O., CHMELÍKOVÁ, D. *Výživové doporučené dávky pro průměrného obyvatele*, Výživa lidu, roč. 45, 1990, s. 7-8
- [17] DEAN, J. *Chemické dělicí metody*, SNTL, Praha, 1974

- [18] Dostupné na <http://cs.wikipedia.org/wiki/Chromatografie>
- [19] OPEKAR, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, Karolinum, Praha, 2003
- [20] Dostupné na http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc
- [21] CHURÁČEK, J. *Analytická separace látek*, SNTL, Praha, 1990
- [22] Dostupné na http://tomcat.bf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/kapal_chrom_vyber.htm
- [23] Dostupné na <http://natur.cuni.cz/~pcoufal.html>
- [24] Dostupné na <http://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC>
- [25] Dostupné na <http://mzcr.cz/data/c764/lib/ajalb.htm>
- [26] KARDOŠ, E., BEREK, D. *Základy kvapalinovej chromatografie*, ALFA Bratislava, 1978
- [27] Dostupné na http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm
- [28] DOUŠA, M., HOSMANOVÁ, R. *HPLC stanovení obsahu vitamínu E v krmných surovinách, krmivech a potravinách*, Chemické Listy, roč. 101, 2007, s. 578-583
- [29] Dostupné na <http://sweb.cz/HPLC1/index.html>
- [30] *Stanovení vitamínu E v margarínu a tučích přímou extrakcí metodou HPLC*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., roč. 21, 1998, s. 1227
- [31] UBALDI, A., SERVENTI, P., DELBONO, G. *Determination of vitamin E levels in aged cheeses*, Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, vol. XXVI, 2006, p. 137-144
- [32] KORCHAZHKINA, O., JONES, E., CZAUDERNA, M., SPANCER, S.A., KOWALCZYK, J. *HPLC with UV detection for measurement of vitamin E in human milk*, Acta Chromatographica, vol. 16, 2006
- [33] UBALDI, A., DELBONO, G., FUSARI, A., SERVENTI, P. *Quick HPLC method to determine vitamin E concentration in cow's milk*, Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, vol. XXV, 2005, p. 101-110

- [34] LIU, Q., SCHELLER, K.K., SCHAEFER, D.M. *Technical Note: A simplified procedure for vitamin E determination in beef muscle*, *Jurnal Of Animal Science*, vol. 74, 1996, p. 2406-2410
- [35] POPA, M., ISRAEL-ROMING, F., TURTOI, M. *Vegetable oils – sources of PUFA and antioxidants to obtain omega 3 eggs*, *International Symposium on „Functional Foods in Europe – International Developments in Science and Health Claims”*, Malta, 2007
- [36] ZHAO, B., THAM, S-Y., LU, J., LAI, M.H., LEE, L., MOOCHHALA, M. *Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*, *J Pharm Pharmaceut Sci*, vol. 72, 2004, p. 200-204

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
CC	Sloupcová chromatografie
PP	Papírová chromatografie
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
GC	Plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie
LLC	Rozdělovací chromatografie
LSC	Adsorpční chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
RP	Reverzní fáze
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Viditelná oblast spektra
DAD	Detektor diodového pole
MS	Hmotnostní spektrometr
KOH	Hydroxid draselný
HCl	Kyselina chlorovodíková

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Možnost uspořádání kapalinového chromatografu.....	18
Obr. 2 Lineární dávkovač.....	19
Obr. 3 Dávkovací kohouty.....	19
Obr. 4 Chromatografická kolona.....	20
Obr. 5 Fotometrický detektor.....	21
Obr. 6 Detektor s diodovým polem.....	22
Obr. 7 Fluorimetrický detektor.....	22
Obr. 8 Refraktometrický detektor.....	23

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Vlastnosti α -tokoferolu	10
Tab. 2 Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách	13

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Obsah tokoferolů a tokotrienolů ve vybraných potravinách

Příloha II: Doporučené denní dávky

Příloha III: Výrobky s vitamínem E

Příloha IV: Hlavní části HPLC

Příloha V: Ukázka chromatogramů

PŘÍLOHA I: Obsah tokoferolů a tokotrienolů ve vybraných potravinách

Potravina	Obsah [mg.kg ⁻¹]								
	<i>α-T</i>	<i>β-T</i>	<i>γ-T</i>	<i>δ-T</i>	<i>α-TT</i>	<i>β-TT</i>	<i>γ-TT</i>	<i>δ-TT</i>	<i>α-TE</i>
Pšeničná mouka	2,8	2,4	<0,3	<0,3	2,7	14,0	<0,3	<0,3	5,5
Rýže obyčejná	2,5	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	6,8	<0,3	2,5
Rýže hnědá	8,7	2,1	2,6	<0,3	8,8	<0,3	28,1	3,4	12,7
Rýže parboiled	2,1	<0,3	<0,3	<0,3	2,5	<0,3	7,5	<0,3	2,9
Fazole bílé	0,9	<0,3	38,3	1,9	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	4,7
Čočka	9,0	<0,3	41,4	1,0	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	13,2
Sója	14,7	1,7	90,1	15,2	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	24,7
Olej olivový	134	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	134
Olej řepkový	202	<0,3	81,4	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	210
Olej slunečnicový	477	12,6	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	483
Jáhly proso	2,0	<0,3	8,2	3,6	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	2,9
Pohanka	3,9	<0,3	49,1	2,1	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	8,8
Vločky pšeničné	5,2	3,2	<0,3	<0,3	5,3	19,2	<0,3	<0,3	9,3
Vločky ječné	2,3	<0,3	0,9	0,7	22,9	4,0	9,5	1,2	9,4
Sušené mléko plnotučné	4,1	<0,3	0,6	<0,3	0,3	<0,3	<0,3	<0,3	4,3
Sušené mléko odtučněné	0,8	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	0,8
Ořechy vlašské	8,3	<0,3	58,2	3,1	<0,3	<0,3	1,0	<0,3	14,2
Ořechy lískové	129	2,7	25,6	1,0	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	133
Mák	9,8	<0,3	31,7	<0,3	<0,3	<0,3	1,4	<0,3	13,0
Lněné semínko	2,0	<0,3	87,3	0,8	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	10,7

T - tokoferol

TT – tokotrienol

TE – ekvivalent α -tokoferolu

PŘÍLOHA II: Doporučené denní dávky

	Věk (roky)	α -tokoferol [mg]
Kojenci	0,0-0,5	3
	0,5-1,0	4
Děti	1-3	6
	4-6	7
	7-10	7
Muži	11-14	10
	15-18	10
	19-24	10
	25-50	10
	51+	10
Ženy	11-14	8
	15-18	8
	19-24	8
	25-50	8
	51+	8
Těhotné ženy		10
Kojící ženy		12

Údaje z Recommended Dietary Allowances, 10th Edition. Food and Nutrition Board, National Research Council–National Academy of Sciences, 1989

PŘÍLOHA III: Výrobky s vitamínem E



PŘÍLOHA IV: Hlavní části HPLC

HPLC 1200



Zásobník mobilní fáze LTC 02



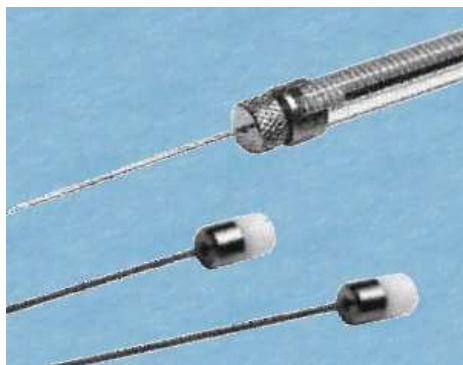
HPLC čerpadlo Smartline 1000



Membránové čerpadlo M401



Mikrodávkoč Hamilton –
vyměnitelná tupá jehla pro HPLC



Ventil D dávkovací analytický



Kolona



HPLC kolonový termostat Smartline 4000

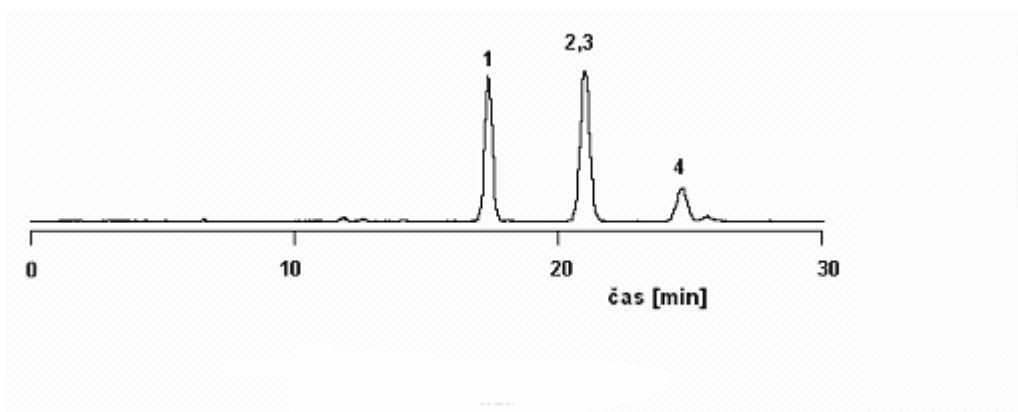
UV detektor Smartline 2600



Refraktometrický detektor Shodex RI-101



PŘÍLOHA V: Ukázka chromatogramů



Kolona: 4,6 x 150 mm

Mobilní fáze: methanol + voda

Průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹

Teplota kolony: 30°C

Detekce: UV 295 nm

Vzorky: 1. δ-tokoferol

2. γ-tokoferol

3. β-tokoferol

4. α-tokoferol

