

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**STANOVENÍ VYBRANÝCH VITAMINŮ ROZPUSTNÝCH
V TUCÍCH POMOCÍ HPLC**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Pavla Novotná

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**DETERMINATION OF SELECTED VITAMINS SOLUBLE
IN FATS USING HPLC**

THESIS

AUTOR: Bc. Pavla Novotná

SUPERVISOR: Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla NOVOTNÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Stanovení vybraných vitamínů rozpustných v tucích pomocí HPLC**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část
 - a) Prostudujte problematiku vitamínů a zaměřte se na význam a funkci retinolu, - tokoferolu, lykopenu a -karotenu v lidském organismu.
 - b) Seznamte se s literárními údaji popisující možnosti stanovení výše uvedených vitamínů. Pro rešerši využijte dostupné databáze (Medline, Current Contents apod.)
- 2) Praktická část
 - a) Zaveďte HPLC metodu pro stanovení výše uvedených vitamínů v lidské plazmě.
 - b) Určete analytické parametry metody (přesnost, správnost, linearita, apod.)
 - c) Stanovte referenční hodnoty vybraných vitamínů v plazmě dobrovolných dárců krve a porovnejte s literárními údaji.
 - d) Stanovte hladiny vybraných vitamínů v plazmě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:
podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2009

.....
Pavla Novotná

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D., za odborné vedení a pomoc v průběhu experimentu a za pomoc při zpracování naměřených výsledků, a Mgr. Pavle Žákové, Ph.D., za pomoc v průběhu experimentu.

Také děkuji všem dobrovolným dárcům krve a pacientům s kardiovaskulárním onemocněním, kteří poskytli vzorky krve.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za veškerou podporu během mého studia.

SOUHRN

Stanovili jsme hladiny vybraných vitaminů rozpustných v tucích v plazmě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a u dárců krve (n = 129) pomocí HPLC na obrácených fázích s UV/VIS detekcí.

Retinol, α -tokoferol, β -karoten a lykopen byly separovány na koloně Discovery HS C18 (15 cm x 4 mm, 5 μ m) užitím isokratické eluce. Použitá mobilní fáze byla směsí methanolu a ethanolu (75:25, v/v) a průtok dosahoval 0,8 ml.min⁻¹. Vitaminy byly stanoveny současně s použitím dvou vnitřních standardů, retinyl acetátu pro retinol a karotenoidy a tokoferol acetátu pro α -tokoferol.

Přesnost v sérii, vyjádřená variačním koeficientem byla 4,9% pro retinol, 2,6% pro α -tokoferol, 4,7% pro β -karoten a 21,6% pro lykopen. Správnost metody vyjádřená výtěžností metody pro retinol, α -tokoferol, β -karoten a lykopen byla následující: 95,5% (CV 6,2%), 91,5% (CV 4,5%), 90,4% (CV 3,2%) a < 50%.

KLÍČOVÁ SLOVA: Vitamin A, vitamin E, β -karoten, lykopen, HPLC, UV/VIS detekce.

SUMMARY

We have measured the levels of selected vitamins soluble in fats in plasma of patients with cardiovascular disease and blood donors (n = 129) by reverse-phase HPLC with UV/VIS detection.

Retinol, α -tocopherol, β -carotene and lycopene were separated on a column Discovery HS C18 (15 cm x 4 mm, 5 μ m) with isocratic elution. As mobile phase was used the mixture of methanol and ethanol (75:25, v/v) and the flow rate was 0.8 ml.min⁻¹. The vitamins were determined simultaneously using two internal standards, retinyl acetate for retinol and carotenoids and tocopherol acetate for α -tocopherol.

The intra-assay coefficient of variation for retinol, α -tocopherol, β -carotene and lycopene were 4.9%, 2.6%, 4.7% and 21.6%. The recoveries were as follow: 95.5% (CV 6.2%), 91.5% (CV 4.5%), 90.4% (CV 3.2%) and < 50%.

KEYWORDS: Retinol, α -tocopherol, β -carotene, lycopene, HPLC, UV/VIS detection.

SEZNAM ZKRATEK

BTH	butylovaný hydroxytoluen
CV	variační koeficient
IS	vnitřní standard
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
M.F.	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PCI	perakutní koronární zásah
RBP	retinol vázající protein
RONS	reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku
SD	směrodatná odchylka
UV/VIS	ultrafialové/viditelné spektrum

OBSAH

1 ÚVOD	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	12
2.1 Vitaminy rozpustné v tucích	12
2.1.1 Karotenoidy	12
2.1.2 Vitamin A	13
2.1.3 Vitamin E	15
2.1.4 β -Karoten	16
2.1.5 Lykopen	17
2.2 Vliv antioxidantů na kardiovaskulární onemocnění	18
2.2.1 Antioxidanty	18
2.2.2 Kardiovaskulární onemocnění	18
2.2.3 Působení antioxidantů	19
2.3 Stanovení vitaminů rozpustných v tucích	21
2.3.1 Příprava vzorku	21
2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	22
2.3.2.1 Stacionární fáze	23
2.3.2.2 Mobilní fáze	23
2.3.2.3 Vnitřní standard	23
2.3.2.4 Identifikace a detekce látek	24
2.3.3 Ramanova spektrometrie	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Seznam chemikálií	27
3.2 Seznam přístrojů	27
3.3 Soubor pacientů	28
3.4 Příprava roztoků	29
3.5 Stanovení α -tokoferolu, retinolu, β -karotenu a lykopenu	31
3.5.1 Kalibrační řada	31
3.5.2 Příprava vzorků a standardů	32
3.5.3 Extrakce	32
3.5.4 Příprava mobilní fáze	32
3.5.5 Parametry HPLC analýzy	33

3.5.6 Analytické parametry	33
3.5.7 Vyhodnocení	34
4 VÝSLEDKY	35
4.1 Kalibrační křivky	35
4.2 Chromatografické záznamy	38
4.3 Analytické parametry	40
4.3.1 Přesnost v sérii	40
4.3.2 Správnost	40
4.3 Distribuce hladin vitaminů rozpustných v tucích	41
4.3.1 Retinol	41
4.3.2 α -Tokoferol	42
4.3.3 β -Karoten	44
4.3.4 Lykopen	45
4.4 Korelace mezi hladinami jednotlivých vitaminů a věkem	47
4.5 Porovnání hladin jednotlivých vitaminů mezi skupinami	48
5 DISKUSE	51
6 ZÁVĚR	54
7 LITERATURA	55
8 PŘÍLOHY	60

1 ÚVOD

V posledních několika letech je pozornost vědců zaměřena na zvýšený výskyt civilizačních onemocnění (např. kardiovaskulární onemocnění, KVO) ve vyspělých státech světa. Je sledován vliv reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku na organismus, příčiny jejich vzniku a hlavně možnosti zabránění jejich škodlivého působení, jež může vést k rozvoji KVO.

Vitaminy rozpustné v tucích (vitamin A, α -tokoferol, β -karoten a lykopen) jsou antioxidanty, látky, které vychytávají již vzniklé radikály a brání tak jejich vlivu na organismus. Velmi důležitá je proto dostatečná hladina těchto látek v krvi.

Cílem této práce je zavést metodu stanovení uvedených antioxidantů a stanovit koncentrace jednotlivých látek v plazmě dobrovolných dárců krve a pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Ke stanovení byla užitá metoda HPLC s UV/VIS detekcí.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vitaminy rozpustné v tucích

Vitaminy jsou látky organického původu. Mohou se dělit dle rozpustnosti na vitaminy rozpustné ve vodě a vitaminy rozpustné v tucích. Mezi vitaminy rozpustné ve vodě se řadí vitaminy B komplexu (thiamin, riboflavin, niacin, kyselina pantothenová, pyridoxin, biotin, vitamin B₁₂, kyselina listová) a vitamin C. Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří vitamin A, D, E a K.

Vitaminy mají v organismu různé biochemické funkce a jsou převážně doplňovány z potravy. Proto jejich nedostatek nebo nízký příjem potravou může vést k závažným chorobám.

2.1.1 Karotenoidy

Karotenoidy se řadí mezi běžné přírodní pigmenty. Jsou zodpovědné nejen za červené, oranžové a žluté zbarvení listů rostlin, ovoce a květin, ale také za zbarvení některých ptáků, hmyzu, ryb a korýšů. Doposud bylo charakterizováno více než 600 různých karotenoidů, z nichž jen několik bylo nalezeno v lidské plazmě. Dělí se do dvou tříd: karotenoidy obsahující kyslík - xantofyly (např. lutein, zeaxantin) a uhlovodíkové karotenoidy (např. lykopen, β -karoten, α -karoten).

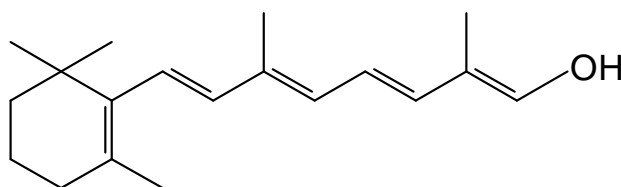
Karotenoidy jsou syntetizovány pouze rostlinami, bakteriemi, houbami a řasami. Živočichové je získávají až ze své potravy.

Slouží jako antioxidanty. Chrání buňky a tkáně před oxidativním poškozením. Zmenšují tak riziko degenerativních poruch jako jsou různé typy rakoviny, kardiovaskulární a oftalmologické onemocnění. Některé karotenoidy mohou sloužit také jako zdroj vitaminu A (1).

2.1.2 Vitamin A

Vitamin A, dříve známý také jako axeroftol, je nejdéle známým vitaminem. Řadí se mezi vitaminy rozpustné v tucích. Jeho struktura byla stanovena počátkem 20. století (2).

Po chemické stránce je alkoholem. Obsahuje ve své molekule šestičlenný β -iononový kruh s bočním řetězcem složeným ze dvou isoprenoidních jednotek. Existuje ve dvou přirozených formách, jako vitamin A1 (retinol) a vitamin A2 (3-dehydroretinol), které se liší počtem dvojných vazeb v šestičlenném kruhu (2).



Obr. 1 Retinol (3)

Retinol (all-*trans* forma) je biologicky aktivní a nejběžnější forma ve zvířecí tkáni. Tvoří bledě žluté krystalky rozpustné v organických rozpouštědlech. Snadno se zničí ultrafialovým zářením, kyselinami, kyslíkem a teplem.

V organismu metabolizuje na několik biologicky aktivních látek – retinoidů. Mezi ně patří kyselina retinová nebo retinal, který je důležitým prvkem pigmentu zraku (3).

Vitamin A je přijímán v potravě přímo nebo ve formě provitaminu, např. β -karotenu, který se ve střevě štěpí působením β -karoten-15,15'-dioxygenasou na dvě molekuly retinalu. Ty jsou poté redukovány na all-*trans*-retinol a esterifikovány dlouhým řetězcem mastné kyseliny (hlavně kyseliny palmitové). Po absorpci je retinol transportován přes chylomikrony do jater, kde je buď skladován jako retinyl ester, nebo je znovu transportován do plazmy jako volný alkohol navázaný na specifickou bílkovinu RBP (retinol vázající protein). Ta umožňuje transportovat retinol do potřebných tkání (3).

Vitamin A se vyskytuje pouze v živočišných potravinách. Oproti tomu, provitaminy A pocházejí převážně z rostlinné potravy a jsou v těle s různým stupněm účinnosti přeměňovány na vitamin A.

Jeho zdrojem je především rybí tuk, vnitřnosti, máslo, sýry a mléko. Nejvíce je zastoupen v játrech (2).

Doporučená dávka vitaminu A je 900 μg RAE/den pro muže starší 19 let a 700 μg RAE/den pro ženy stejného věku. RAE je ekvivalent retinové aktivity. Je definován jako: 1 μg RAE = 1 μg all-*trans*-retinolu = 12 μg all-*trans*- β -karotenu = 24 μg ostatních karotenoidů – provitaminů A (2).

Vitamin A patří spolu s vitaminem D mezi jediné vitaminy, u nichž může nadměrný příjem potravou nebo vitaminovými doplňky způsobit hypervitaminózu.

Hypervitaminóza A se projevuje zvýšenou koncentrací vitaminu A v krvi se symptomy akutní (při krátkodobém působení) nebo chronické toxicity. Symptomy akutní toxicity jsou bolesti hlavy, nauzea a zvracení. U chronické toxicity se vyskytuje navíc dvojitě vidění, ztráta vlasů, suchost sliznice, olupování kůže, bolesti kostí a kloubů, poškození jater, krvácení a následně až kóma (3).

Proto je nejvyšší tolerovaná hranice příjmu retinolu rovna 3000 μg /den pro muže i ženy. U dětí je tato hodnota nižší (2).

Avitaminóza A je nedostatek vitaminu A. Vyvíjí se pomalu, neboť organismus jej čerpá ze svých zásob v játrech. Projevuje se problémy se zrakem, nejprve ztrátou vidění za šera a při dlouhodobém velkém nedostatku může dojít až k oslepnutí.

Dalšími projevy hypovitaminózy jsou problémy s kůží a sliznicemi (suchost kůže, odlupování, změny na průduškách se zvýšenou náchylností k infekcím) a v ledvinách se snadněji tvoří kameny (2).

Koncentrace vitaminu A v plazmě se pohybuje v rozmezí 2,40-3,23 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (4).

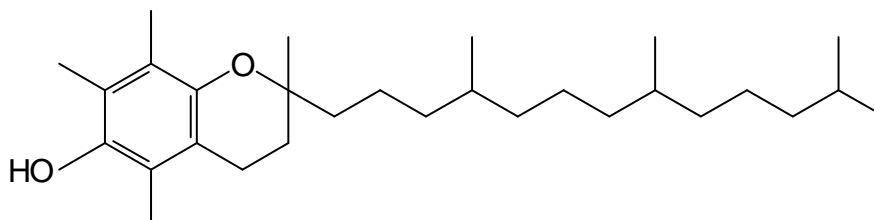
Vitamin A je potřebný pro normální růst a rozvoj. Hraje důležitou roli v mnoha metabolických procesech. Je potřebný pro vidění, má úlohu v reprodukci (syntéze pohlavních hormonů, spermatogenezi, v početí a formování placenty), v genetické regulaci, v regulaci buněčného dělení, při zvýšení imunitní odpovědi, přestavbě kostí a ve všech stádiích vývoje plic (3).

2.1.3 Vitamin E

Vitamin E byl objeven v roce 1922 v zelené listové zelenině Robertem Evansem a Katharinou Bishop. Protože podporoval plodnost, byl pojmenován jako tokopherol (z řečtiny tokos – porod, phero – zrodit, ol – označení alkoholu) (5).

Vitamin E je souhrnný název pro molekuly vykazující biologickou aktivitu R, R, R- α -tokoferolu. V přírodě se přirozeně vyskytuje osm látkových forem vitamínu E: α -, β -, γ - a δ -tokoferol a α -, β -, γ - a δ -tokotrienol (5, 6). Jejich molekuly se skládají z chromanového jádra a postranního řetězce (2). Tokotrienoly se od tokoferolů liší jen tím, že mají nenasycený boční řetězec (6).

Nejvíce rozšířený je α -tokoferol (5,7,8-trimethyltokol).



Obr.2 α -Tokoferol (2)

Tokoferoly se tvoří jen v rostlinách a jsou přítomny ve všech lipidech rostlinného původu. Jejich zdrojem jsou převážně ořechy (vlašské, burské), pšeničné klíčky, rostlinné oleje a potraviny obsahující tyto oleje, celozrnné rostlinné výrobky, semena, zelená listová zelenina a luštěniny (2).

Denní příjem α -tokoferolu potravou je 6,4 – 12,6 mg. Užíváním různých vitaminových doplňků může být hodnota vyšší. I když nebyly nalezeny závažné komplikace při vyšším příjmu, nemělo by přijaté množství přesáhnout horní hranici, která byla nastavena na 1g/den (7).

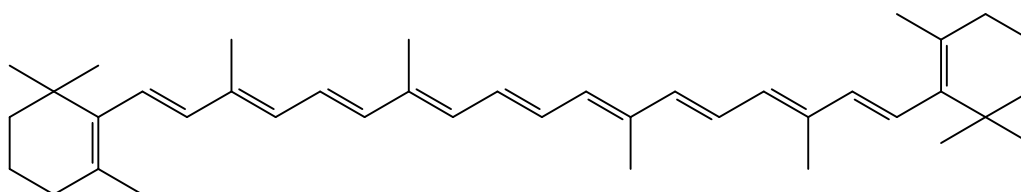
Koncentrace α -tokoferolu v plazmě se pohybuje v rozmezí 22,4-29,6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (4).

Hlavní funkcí vitamínu E je role antioxidantu. Inhibuje propagaci lipidové peroxidace a takto chrání membrány nebo lipoproteiny před oxidativním poškozením (8).

2.1.4 β -Karoten

β -karoten je přírodním pigmentem, syntetizovaným rostlinami a mikroorganismy (9). Je nejvýznamnějším provitaminem vitamínu A. Rozštěpením jeho molekuly vznikají dvě molekuly vitamínu A (10).

Molekula β -karotenu se skládá ze dvou β -iononových kruhů spojených čtyřmi isoprenovými jednotkami (2).



Obr.3 β -Karoten (11)

β -Karoten se vyskytuje v zelené listové zelenině a v oranžovém a žlutém ovoci a zelenině (10). Nalezneme ho ve vysoké koncentraci v mrkvi. Mezi další zdroje patří např. mango, sladké brambory, meruňka, dýně, kapusta, špenát, paprika, rajčata, petržel kadeřavá, hlávkový a římský salát (2, 9, 10).

V přírodě ho nalezneme s ostatními karotenoidy převážně v *all-trans* formě, ale zpracováním ovoce a zeleniny dochází ke vzniku *cis*-izomerů. Stupeň izomerace je závislý na intenzitě a trvání tepelného zpracování (9).

Doporučená denní dávka příjmu β -karotenu je 2-4 mg/den. Aby se z potravy vstřebal, je nutné ho uvolnit z matrice. β -Karoten je spolu s ostatními karotenoidy pevně vázán k makromolekulám. Proto je třeba narušit tyto vazby (mechanicky, tepelným zpracováním) v přítomnosti malého množství tuků, do kterého se rozpouští (2). Do krve je přenášen pomocí chylomikronů, kde je pak transportován lipoproteiny (většina β -karotenu prostřednictvím frakce LDL).

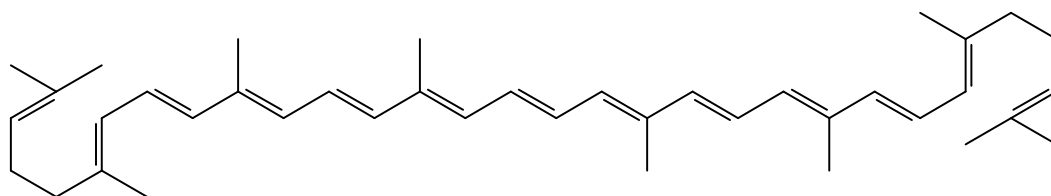
Koncentrace β -karotenu v plazmě se pohybuje v rozmezí 0,105-0,220 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (4).

Při hodnocení hladin β -karotenu v plazmě je nutno vzít v úvahu roční období, ve kterém byl odběr uskutečněn. Důvodem je závislost na skladbě potravy (2).

Při nedostatku β -karotenu v potravě je poločas jeho úbytku v plazmě kratší než 12 dní (2).

2.1.5 Lykopen

Lykopen je acyklický izomer β -karotenu, který je tvořen 8 isoprenovými jednotkami (2). Obsahuje 11 lineárně uspořádaných konjugovaných dvojných vazeb (11) a dvě vazby nekonjugované (12). Ve své struktuře nemá β -iononový kruh, proto nemá aktivitu provitaminu A (2).



Obr.4 all-*trans*-Lykopen (11)

Je vysoce lipofilní látkou a významným antioxidantem. Potravou je přijímán v přítomnosti tuku a spolu s β -karotenem je v organismu prvotně transportován pomocí LDL částic, umožňující jim ochranu proti oxidaci (13). Nejčastěji je umístěn v buněčných membránách a jiných lipidových složkách (12). Nalezneme ho ve vyšších koncentracích ve varlatech a nadledvinách. Dále se nachází v ledvinách, vaječnicích a tukové tkáni (11).

Koncentrace lykopenu v lidské plazmě tvoří směs *trans* a *cis* izomerů v poměru asi 1:1. V rostlinných zdrojích se převážně vyskytuje v *trans* konfiguraci, což je nejvíce stabilní forma (12).

Lykopen je dostupný jen v malém počtu rostlinné potravy, narozdíl od ostatních karotenoidů. Nejvíce je přítomen v červeném ovoci a zelenině, hlavně v rajčatech a jeho zpracovaných produktech (šťáva, kečup, pasty a omáčky). Také se nachází ve vodním melounu, v růžových grapefruitech, meruňkách a růžovém guava (12, 13).

Jako polyen podstupuje lykopen *trans-cis* izomeraci vyvolanou světlem, tepelnou energií nebo chemickými reakcemi. Například teplem zpracovaná rajčata a rajčatové produkty indukují izomeraci *trans* formy na *cis*, která má vyšší biologickou aktivitu (12).

Koncentrace lykopenu v plazmě se pohybuje v rozmezí 0,116-0,266 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (4).

Při nedostatku lykopenu v potravě se jeho poločas úbytku v plazmě pohybuje mezi 12-33 dny. To je delší doba než u β -karotenu (2).

2.2 Vliv antioxidantů na kardiovaskulární onemocnění

2.2.1 Antioxidanty

Antioxidanty jsou ochranné látky, které brání tvorbě nadměrného množství reaktivních forem kyslíku (např. hydroxylový radikál $\cdot\text{OH}$, singletový kyslík $^1\text{O}_2$) a dusíku (např. radikál oxidu dusnatého $\cdot\text{NO}$). Děje se to prostřednictvím aktivity enzymů, jako je superoxiddismutasa a katalasa, nebo působením proteinů vázajících přechodné prvky (železo, měď), bránící tak jejich katalýze v radikálové reakci.

Mezi antioxidanty patří také látky, které zachytávají a odstraňují již vzniklé radikály (např. vitamin C, α -tokoferol, karotenoidy a glutathion). Jsou označovány podle jejich působení jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášeče (quenchers) (14).

2.2.2 Kardiovaskulární onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění je onemocnění postihující srdce a cévy. Je způsobeno rozvojem aterosklerotických změn v cévní stěně působením ovlivnitelných (vysoká hladina celkového cholesterolu a LDL, kouření, obezita aj.) a neovlivnitelných faktorů (genetické faktory).

Oxidační stres je jedním z faktorů dnešní doby vyvolaný uspěchaným stylem života. Je důsledkem nerovnováhy mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS) a antioxidační kapacitou konkrétní tkáně. Vyšší hladiny RONS se podílejí ve tkáních

na modifikaci – změně struktury a funkcí bílkovin a lipidů. Mohou poškodit také nukleové kyseliny.

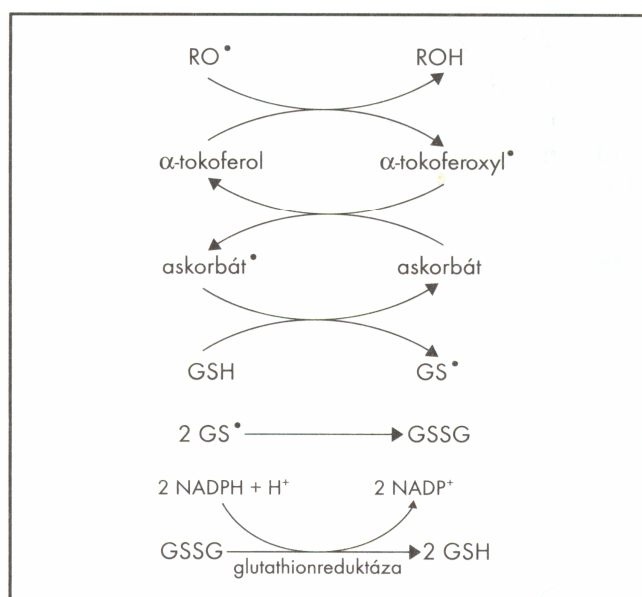
Hlavním prvkem vzniku aterosklerotického procesu ve stěně cévy je oxidační modifikace LDL, která nastává působením kyslíkatých radikálů na LDL lipoproteiny při jejich průchodu cévní stěnou. Pozměněné lipoproteiny jsou vycytávány makrofágy, u nichž dochází po nahromadění těchto látek k přeměně na pěnovou buňku. Prvotní fáze aterosklerózy je tedy charakterizována vznikem pěnových buněk, jejichž akumulací se vytvářejí tukové proužky, dále intermediální léze a nakonec ateromy (2).

Klinicky se onemocnění cév projevuje jako ischemická choroba srdeční ve formě akutního infarktu myokardu nebo anginy pectoris. Dalšími projevy jsou vysoký krevní tlak a mozková mrtvice (2).

2.2.3 Působení antioxidantů

Vitaminy rozpustné v tucích mají významnou roli v organismu jako antioxidanty působící proti RONS. Snaží se svým vlivem zpomalit nebo zabránit oxidativnímu poškození okolní tkáně vyskytující se v blízkosti RONS.

α -Tokoferol je hlavním v tuku rozpustným antioxidantem. V lidském organismu působí jako účinný antioxidant membrán (2). Brání tak peroxidaci vícenenasycených mastných kyselin, které se vyskytují v buněčných a nitrobuněčných fosfolipidech (jako např. mitochondrií, endoplazmatického retikula a plazmatických membránách) (18). α -Tokoferol chrání lipidy vycytáváním peroxylových radikálů, přeměňující je na hydroperoxydy, jež dále odstraňuje glutathionperoxidasa. Touto reakcí vznikají také tokoferoxylové radikály, které mohou způsobovat další poškození. Proto je nutná jejich regenerace do původní formy uskutečněná reakcí např. s kyselinou askorbovou a dalšími látkami, jako je redukovaný glutathion a koenzym NADPH (2, 16, 17).



Obr.5 Antioxidační účinek α -tokoferol a jeho regenerace (16)

Antioxidační účinky α -tokoferolu působí při vysoké koncentraci kyslíku. Proto se α -tokoferol nejvíce hromadí v membránách, které jsou vystaveny vyššímu parciálnímu tlaku kyslíku (v membránách erytrocytů a dýchacího ústrojí) (18).

Vitamin A má jen mírné antioxidační účinky. Preventivní efekt jeho vlivu je proto minimální. Působí jako zhášec singletového molekulárního kyslíku (1O_2), metabolitu, jež není sice považován za volný radikál, ale je to velmi reaktivní oksylichující agens o vysoké energii (2). Zhášení singletového kyslíku je umožněno schopností vitaminu A a jiných látek (retinoidů, karotenoidy) absorbovat energii bez chemické změny. Excitovaný (1O_2) se poté vrátí do základního molekulárního stavu bez poškození okolních tkání (2).

β -Karoten hraje hlavní roli při vychytávání volných kyslíkových radikálů ve tkáních při nízkém parciálním tlaku kyslíku. Významně se tak doplňuje s antioxidačním působením α -tokoferolu (18, 19), který je účinný při vyšších koncentracích (18). Vychytává peroxylové radikály za vzniku β -karotenového radikálu, který je vysoce stabilní a poměrně nereaktivní. β -Karotenové radikály mohou dále podstoupit rozklad na neradikálové produkty nebo mohou reagovat s dalšími volnými radikály (10). β -Karoten s ostatními karotenoidy (lykopen) a vitaminem A je také významným zhášečem singletového molekulárního kyslíku (2).

2.3 Stanovení vitaminů rozpustných v tucích

Analytické stanovení látek závisí na charakteru vzorku, na chemických vlastnostech sledovaných analytů a jejich funkčních skupinách. Pomocí různých metod se určuje přítomnost hledaných složek a jejich množství.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je nejvíce používanou metodou pro stanovení karotenoidů, tokoferolů a retinolu. Zvolení vhodných podmínek (mobilní a stacionární fáze, průtok a teplota) dochází k separaci těchto látek na koloně. Průběh separace je možno detekovat různými typy detektorů.

Jednou z méně užívaných metod je superkritická fluidní chromatografie (20).

Neinvazivní metodou stanovení je Ramanova spektrometrie (21).

Důležitou vlastností při stanovení látky je její rozpustnost v konkrétním rozpouštědle. Analyty rozpustné ve vodě se dělí do tří skupin, iontové, disociované a nedisociované sloučeniny. Analyty rozpustné v organických rozpouštědlech se rozdělují na rozpustné v methanolu a rozpustné v hexanu (22).

Retinol a α -tokoferol jsou látky poměrně polární, rozpustné v různých alkoholech. Jejich nejlepším rozpouštědlem je ethanol.

Karotenoidy jsou látky více lipofilní. Nerozpouští se ve vodě a jejich rozpustnost v methanolu je limitovaná. Vhodným rozpouštědlem je proto např. hexan nebo hexan ve směsi s dichlormethanem.

Dichlormethan ale může, jako jiná vyhovující rozpouštědla karotenoidů (chloroform či tetrahydrofuran), kontaminovat vzorek stopami hydrochloridů a hydroperoxidů, které reagují s karotenoidy a způsobují jejich rozklad (8).

2.3.1 Příprava vzorku

Měření hladiny karotenoidů, tokoferolů a retinolu se provádí v séru, plazmě nebo ve vzorku tkáně. Vzorek je před HPLC analýzou upraven postupem, jenž zahrnuje několik následujících kroků.

1. Deproteinace.

Ke vzorku se přidá ethanol nebo jiný alkohol způsobující precipitaci přítomných bílkovin. V tomto kroku se může přidat i vnitřní standard (8).

2. Extrakce kapalina-kapalina.

V druhém kroku dochází k extrahování analytů z fáze vodní (tedy voda s ethanolem) do fáze organické (nejběžněji hexan), nemísitelné s vodnou fází.

Opakováním extrakce se u této metody dosahuje vyšší výtěžnosti.

3. Odpaření v atmosféře dusíku.

Odebraná organická fáze se odpaří v atmosféře dusíku do sucha. Vzniklý odparek se před analýzou rozpustí v určitém objemu rozpouštědla (nelépe mobilní fáze).

Tkáňové vzorky, oproti vzorkům z plazmy nebo séra, se musí před extrakcí homogenizovat. To se provádí pomocí tkáňového homogenizátoru nebo rozmělněním malých nakrájených kousků vzorku, které byly zmrazeny tekutým dusíkem. Homogenizovaný vzorek může být poté extrahován organickým rozpouštědlem jako u přípravy séra.

Homogenní vzorek lze získat také aplikací alkalické saponifikace nebo enzymatického trávení tukové a kožní tkáně. Nevýhodou těchto metod je možná ztráta stanovovaných složek v důsledku inkubace za zvýšené teploty (25-37°C) (8).

2.3.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Pro analýzu látek stanovovaných metodou HPLC je důležitý výběr stacionární a mobilní fáze a detektoru. Základem jsou znalosti o chemických vlastnostech stanovovaných složek.

2.3.2.1 Stacionární fáze

Stacionární fáze je nepohyblivou složkou kapalinové chromatografie, navázanou na kulových částicích ze silikagelu či skla o průměru 3-10 μm . Je umístěna v koloně, která dosahuje délky 10 až 30 cm a vnitřního průměru 1-5 mm (22).

Karotenoidy, α -tokoferol a retinol se separují na obrácených fázích. Na nosiči jsou navázány silanové skupiny s nepolárními alkyly (např. oktyl, oktadecyl). Analýza se provádí především s navázanými alkyly oktadecylu (C18). Avšak v posledních letech se využívají také kolony C30 (alkyly triakontylu) (1), které umožňují lepší rozlišení karotenoidů a jejich izomerů (23, 24).

2.3.2.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze je pohyblivým prvkem kapalinové chromatografie. Přes kolonu je protlačována za vysokého tlaku působením čerpadla, které svou činností udává rychlost průtoku.

Analyty lze stanovovat dvěma typy měření. Gradientovou elucí, kdy se během analýzy mění složení mobilní fáze. Ta je pomocí programu smíchávána ze dvou a více zásobníků do určitého procentuálního zastoupení. U isokratického stanovení je složení mobilní fáze stejné v průběhu celé analýzy.

Při separaci na obrácených fázích jsou hlavními rozpouštědly voda, methanol, ethanol a acetonitril. Nejčastěji se jedná o směs dvou nebo tří rozpouštědel, jejichž poměr ovlivňuje selektivitu stanovení pro různé analyty (22).

2.3.2.3 Vnitřní standard

Vnitřní standard je látka přidávaná ke vzorku ke zlepšení opakovatelnosti a přesnosti kvantitativního stanovení (8).

Vnitřní standard by měl splňovat tyto základní požadavky:

1. Měl by se analytu podobat chemickými a fyzikálními vlastnostmi co nejvíce je to možné.
2. Neměl by být běžnou složkou vzorku.
3. Vnitřní standard a analyt by měly být rozděleny na chromatogramu základnou a eluovat blízko sebe. Odpověď obou složek na detekční systém by měla být stejná. Látky by měly být přítomny v téměř stejných koncentracích (25).

4. Měl by být definovanou stabilní sloučeninou vysoké čistoty.
5. Neměl by interferovat s analytem nebo s jiným signálem z matrix vzorku.
6. Měl by být komerčně dostupný nebo v laboratoři snadno syntetizován (8).

Při stanovení vitaminů rozpustných v tucích se používají vnitřní standardy uvedené v tabulce 1.

Tab. 1 Používané vnitřní standardy

Vnitřní standard	Analyzovaná látka
Tokoferol acetát	α -Tokoferol (26 - 30) Retinol (29) β -Karoten (26)
Tokoferol nikotinát	α -Tokoferol, retinol (31)
Retinyl acetát	Retinol (26 - 28) α -Tokoferol (32) Karotenoidy (33)
Retinol palmitát	Lykopen, β -karoten (30)
Retinol butyrát	Retinol, α -tokoferol (34)
Tocol	α -Tokoferol, retinol, β -karoten (35)
Echinenon	Karotenoidy (27,32)
β -apo-8'-Karotenal	Karotenoidy (29)
Ethyl- β -apo-8'-karotenoát	Lykopen (36)
Nonapreno- β -karoten	Karotenoidy (34)

2.3.2.4 Identifikace a detekce látek

Kvalitativní stanovení hledané složky umožňuje tzv. retenční čas. Je to doba, za kterou stanovovaná látka doputuje od nástřiku k detektoru. Porovnáním retenčních časů standardů s retenčními časy vzorku lze identifikovat jednotlivé stanovované analyty. Intenzita signálu potom určuje množství sledované látky ve vzorku.

Nejběžnější užívané detektory, pro stanovení karotenoidů, tokoferolů a retinolu, jsou UV/VIS detektory.

UV detektor

UV detektor měří při jedné vlnové délce (např. 254 nm – rtuťová výbojka) je velmi citlivý na aromatické a jiné organické sloučeniny, které absorbují výše uvedené záření. Jeho výhodou je velká citlivost, linearita závislosti měřené absorbance na koncentraci a nezávislost signálu na průtokové rychlosti eluátu. Jeho nevýhodou je, že není univerzální, citlivost se mění s hodnotou absorpčního koeficientu látky a používaná mobilní fáze nesmí absorbovat při vlnové délce 254 nm (37).

Univerzálnější jsou detektory umožňující nastavit vlnovou délku (v rozsahu 200-800 nm) pomocí monochromátoru (37).

Detektor s diodovým polem

Nejlepším UV/VIS detektorem je detektor s diodovým polem. Ten proměří absorpční spektrum látky v určené oblasti vlnových délek a uloží si ho do paměti. Detekční limit detektoru je 10^{-10} g.ml⁻¹. Citlivost je stejně jako u UV detektoru různá a při zvolené vlnové délce závisí na velikosti molárního absorpčního koeficientu látky (22).

Fluorescenční detektor

Retinol a tokoferol můžeme měřit také pomocí fluorescenčního detektoru (38). Detekce je založena na principu fluorescence, schopnosti látek absorbovat ultrafialové záření a poté jej emitovat o vyšší vlnové délce (22).

Karotenoidy takto stanovovat nelze, neboť nemají schopnost fluorescence (20). Fluorescenční detektor má detekční limit až 10^{-12} g.ml⁻¹ a je vysoce selektivní pro fluoreskující látky (22).

Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory (např. amperometrické, konduktometrické) jsou velmi selektivní a univerzální (37). Používají se při analýze látek oxidovatelných nebo redukovatelných na polarizovatelné elektrodě (22). Jejich prostřednictvím se stanovují tokoferoly (39), ale také i např. β -karoten (40).

Hmotnostní detektor

Hmotnostní spektrometr jako detektor je velmi specifickou metodou stanovení látek. Umožňuje identifikaci látky, určení její struktury a relativní molekulové hmotnosti. Užívaným způsobem spojení s HPLC analýzou je např. chemická ionizace za atmosférického tlaku (8, 41).

Hmotnostní spektrometry mohou být také spojeny jako tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS), kde po první separaci se požadovaný iont podrobí další reakci a z ní vzniklé ionty jsou analyzovány (22, 41).

Pro sledování metabolismu vitaminů rozpustných v tucích se užívá značení látek uhlíkem C^{13} nebo dvou hexadeuterovaných izotopů ($[^2H_6]\beta$ -karotenu a $[^2H_6]$ retinyl acetátu) sloužící pro rozpoznání účinnosti přeměny karotenoidů a retinoidů (8).

2.3.3 Ramanova spektrometrie

Karotenoidy v kůži lze stanovit také pomocí Ramanovy spektrometrie (21). Je to neinvazivní optická metoda, při níž se detekuje rozptýlené Ramanovo záření vznikající interakcí monochromatického záření (působením laseru) s molekulami vzorku za současné změny jejich vibračních a rotačních stavů. Během vibrace se mění také polarizovatelnost molekuly (22).

Tato metoda se používá ke studiu nepolárních vazeb (C-C, C=C) (22), které se u karotenoidů, řadících se mezi polyeny, vyskytují (21).

Ramanova spektrometrie je metodou, jež nezasahuje do organismu pacienta jako u stanovení vzorku tkáně pomocí HPLC. Má schopnost rozpoznat karotenoidy mezi ostatními antioxidanty v kůži. To je způsobeno unikátní schopností otisku prstů molekul rezonujících dvojných vazeb (21).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Seznam chemikálií

α -Tokoferol (25g, T3251, Sigma, Steinheim, Německo)
Retinol (1 g, R7632, Sigma, Steinheim, Německo)
 β -Karoten (10 g, C9750, Sigma, Steinheim, Německo)
Lycopen (1 mg, 43018, Fluka, Steinheim, Německo)
Lutein (1 mg, X6250, Sigma, Steinheim, Německo)
Retinyl acetát (1 g, R4632, Sigma, Steinheim, Německo)
Retinol palmitát (5 g, R3375, Sigma, Steinheim, Německo)
 α -Tokoferol acetát (25 g, T3376, Sigma, Steinheim, Německo)
 β -apo-8'-Karotenal (1 g, 10810, Fluka, Steinheim, Německo)
2,6-di-tert-butyl-4-methylfenol (100g, B1378, Sigma, Steinheim, Německo)
Ethanol gradient grade (2,5 l, 1.11727.2500, Merck, Darmstadt, Německo)
Methanol gradient grade (2,5 l, 1.06077.2500, Merck, Darmstadt, Německo)
n-Hexan (2,5 l, 1.04391.2500, Merck, Darmstadt, Německo)
Stlačený dusík (Linde Technoplyn, Praha, Česká republika)

3.2 Seznam přístrojů

Pumpa Pye Unicam PU4015 (Pye Unicam, Cambridge, Anglie)
Dávkovací ventil, systém Rheodyne (ECOM, Praha, Česká republika)
Termostat kolon LCO 101 (ECOM, Praha, Česká republika)
Detektor UV/VIS LCD 2048 (ECOM, Praha, Česká republika)
Kolona Discovery HS C18 (15 cm x 4 mm, 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
Držák PEEK filtrů (ESA Inc, Chelmsford, MA, USA)
PEEK filtr (ESA Inc, Chelmsford, MA, USA)
Mikrostríkačka, typ Hamilton (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Švýcarsko)
Centrifuga MR 23i (Jouan SA, St Herblan, Francie)
Centrifuga Sovall TC (Du Pont, Newtown, USA)
Lednice s mrazákem Liebherr (Liebherr, Linz, Německo)
Hlubokomrazící box MDF-U3086S (Sanyo Electric Co., Japonsko)
Ultrazvuková vana K12 (Kraintek, Podhájská, Slovensko)

Termovap (ECOM, Praha, Česká republika)

UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent technologies Inc, Wilmington, DE, USA)

Pipety Finnpiquette (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Multidávkoč (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Zařízení pro výrobu ultračisté vody Milli – Q^{UF}_{plus} (<0,055 µS) (Millipore, Billerica, MA, USA)

Filtrační aparatura Supelco (05110, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze (0,2 µm x 47 mm, Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Vortex Reax top (Heidolph, Frankfurt, Německo)

Třepačka Multi Reax (Heidolph, Frankfurt, Německo)

Analytické váhy LB-105012 (Laberté, Budapešť, Maďarsko)

Nylonové filtry pro filtraci vzorků před HPLC analýzou (nylon 0,22 µm, Corning, NY, USA)

Vývěva KNF Neuberger (KNF Neuberger, Freiburg, Německo)

Laboratorní nádoby

Polyethylenové tmavé mikrozkuřavky (1,5 ml)

Software: Clarity verze 2.6.402 (DataApex, Praha, Česká republika), UV/VIS Chemstation software (Agilent technologies, Wadbronn, BW, Německo), SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc, San Jose, CA, USA)

3.3 Soubor pacientů

Vzorky krve byly odebrány 129 pacientům diagnostikovaných pomocí koronární angiografie pro bolest na hrudi. Pacienti, ve věku 45-69 let, byli rozděleni do tří skupin podle kritérií v tabulce 2.

Tab. 2 Kritéria rozdělení pacientů

Skupina	Kritérium	Počet
PCI	Pacienti s výskytem stenóz a perakutním koronárním zásahem	45
P	Pacienti s výskytem stenóz a bez PCI	37
N	Pacienti bez stenóz se symptomy imitující kardiovaskulární onemocnění	47

Všichni účastníci podstoupili angiografii, vyplnili dotazník a poskytli vzorek krve. Žádný z analyzovaných subjektů netrpěl renálním, jaterním nebo onkologickým onemocněním a nebral vitaminové doplňky. Před začátkem studie byl získán od všech pacientů informovaný souhlas. Studie byla schválena etickou komisí Nemocnice Pardubice (příloha 1).

Vzorky venózní krve byly odebrány do zkumavek obsahujících EDTA mezi 7. a 8. hodinou ranní nalačno. Plazma byla získána centrifugací krevních vzorků při 1500 g po dobu 20 minut a okamžitě uchovávána při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1,5 ml polypropylenových tmavých mikrozkušavkách.

3.4 Příprava roztoků

Zásobní roztok α -tokoferolu

Do 100 ml ethanolu bylo kvantitativně převedeno asi 200 mg α -tokoferolu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok β -karotenu

Do 100 ml hexanu bylo kvantitativně převedeno asi 5 mg β -karotenu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok lykopenu

Do 100 ml hexanu byl kvantitativně převeden asi 1 mg lykopenu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok retinolu

Do 100 ml ethanolu byly kvantitativně převedeny asi 3 mg retinolu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok luteinu

Do 100 ml ethanolu byly kvantitativně převedeny asi 1 mg luteinu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Zásobní roztok retinyl palmitátu

Do 10 ml hexanu bylo kvantitativně převedeno asi 500 mg retinyl palmitátu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v lednici při 4-8 °C.

Zásobní roztok β -apo-8'-karotenalu

Do 10 ml hexanu bylo kvantitativně převedeno asi 5 mg β -apo-8'-karotenalu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při -20 °C.

Zásobní roztok retinyl acetátu

Do 100 ml ethanolu byly kvantitativně převedeno asi 2 mg retinyl acetátu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při -20 °C.

Zásobní roztok tokoferol acetátu

Do 100 ml ethanolu bylo kvantitativně převeden asi 100 mg tokoferol acetátu a roztok byl řádně promíchán. Zásobní roztok byl skladován v mrazáku při -20 °C.

Směs vnitřních standardů

Pro analytické stanovení byla použita směs vnitřních standardů tokoferol acetátu a retinyl acetátu v poměru 1:2. Jeden mililitr zásobního roztoku tokoferol acetátu byl smíchán s 2 ml zásobního roztoku retinyl acetátu a 3 ml ethanolu. Vzniklý roztok byl dokonale promíchán.

3.5 Stanovení α -tokoferolu, retinolu, β -karotenu a lykopenu

α -Tokoferol, retinol, β -karoten a lykopen byly stanoveny v plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí.

3.5.1 Kalibrační řada

Kalibrační řada byla připravena ze směsi zásobních roztoků α -tokoferolu, retinolu, β -karotenu a lykopenu.

Pro každé nové stanovení byly jednotlivé zásobní roztoky čerstvě naředěny tak, aby koncentrace stanovovaných analytů (posledního bodu kalibrace) ve vzniklé směsi byla vyšší než jsou hodnoty fyziologické. Poté byla proměřena absorbance těchto roztoků pomocí spektrofotometru Agilent 8453 (při vlnových délkách: 292 nm pro α -tokoferol, 325 nm pro retinol, 450 nm pro β -karoten a 468 nm pro lykopen) (příloha 10-13).

Hodnoty přesných koncentrací pracovních roztoků byly určeny ze zjištěných absorbancí a molárního absorpčního koeficientu (34, 40, 42).

$$c_{\text{retinolu}} = A / 53000 \text{ (mol.l}^{-1}\text{)} \quad (34)$$

$$c_{\alpha\text{-tokoferolu}} = A \times 248,1 \text{ (}\mu\text{mol.l}^{-1}\text{)} \quad (40)$$

$$c_{\beta\text{-karotenu}} = A \times 4,74 \text{ (}\mu\text{mol.l}^{-1}\text{)} \quad (42)$$

$$c_{\text{lykopenu}} = A \times 3,56 \text{ (}\mu\text{mol.l}^{-1}\text{)} \quad (42)$$

Výsledná směs byla připravena pipetováním 150 μ l z každého pracovního roztoku do jedné mikrozkušavky a následně byl celý obsah této mikrozkušavky důkladně promíchán.

Nakonec byla vytvořena sedmibodová kalibrační řada, kde výsledné koncentrace α tokoferolu dosahovaly (80; 40; 20; 10; 4; 2; 0) $\mu\text{mol.l}^{-1}$, retinolu (5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,25; 0,125; 0) $\mu\text{mol.l}^{-1}$, β -karotenu (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,05; 0,025; 0) $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a lykopenu (0,7; 0,35; 0,175; 0,09; 0,035; 0,017; 0) $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

3.5.2 Příprava vzorků a standardů

Do tmavých mikrozkuvek (1,5 ml) bylo pipetováno 200 μ l plazmy, 200 μ l ethanolu a 20 μ l směsi vnitřních standardů. Celý obsah mikrozkuvek byl dokonale promíchán na vortexu a inkubován po dobu 10-ti minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava kalibračních roztoků byla provedena obdobným způsobem. Do tmavých mikrozkuvek s 200 μ l směšného standardu bylo přidáno 200 μ l deionizované vody a 20 μ l směsi vnitřních standardů. Obsah mikrozkuvek byl dokonale promíchán na vortexu a inkubován 10 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.3 Extrakce

Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 500 μ l n-hexanu. Mikrozkuvky byly protřepávány 10 minut a centrifugovány po dobu 10 minut při 22000 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byla vrchní hexanová vrstva odebrána do nových označených tmavých mikrozkuvek. Tímto způsobem byla extrakce provedena dvakrát.

Spojené hexanové vrstvy byly odpařeny v atmosféře dusíku při laboratorní teplotě. Vzniklé odparky byly až do doby analýzy skladovány v mrazáku ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Odparky standardů a vzorků byly před nadávkováním na chromatografickou kolonu rozpuštěny v 200 μ l mobilní fáze a přefiltrovány pomocí centrifugačních filtrů (22000 g, 5 minut, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.5.4 Příprava mobilní fáze

Jeden litr mobilní fáze (methanol-ethanol, 75:25, v/v) byl připraven smícháním 750 ml methanolu a 250 ml ethanolu. Mobilní fáze byla poté přefiltrována přes nylonový filtr a odvzdušněna po dobu 30 minut v ultrazvuku.

3.5.5 Parametry HPLC analýzy

Mobilní fáze:	methanol-ethanol (75:25, v/v), izokratická eluce
Průtok mobilní fáze:	0,8 ml.min ⁻¹
Dávkovaný objem:	50 µl
Kolona:	Discovery HS C18 (15 cm x 4 mm, 5 µm)
Teplota:	40°C
Detekce:	0-4 min, 325 nm (retinol, retinyl acetát) 4-10 min, 292 nm (α-tokoferol, tokoferol acetát) 10-15.50 min, 468 nm (lykopen) 15.50 –20 min, 450 nm (β-karoten)
Doba analýzy:	20 minut

3.5.6 Analytické parametry

Přesnost v sérii

Přesnost stanovení vitaminů rozpustných v tucích byla určena analýzou 10-ti stejných vzorků plazmy. Vzorky byly analyzovány během jednoho dne. Mírou přesnosti byl použit variační koeficient (CV%), který byl vypočítán podle uvedených vzorců.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - AVG)^2}{n - 1}}$$

$$CV\% = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

(SD – směrodatná odchylka, x_i – koncentrace vzorku i , AVG – průměrná hodnota koncentrací všech vzorků, n – počet vzorků).

Správnost

Správnost metody byla určena pomocí přídavek známého množství stanovované složky (α-tokoferolu, retinolu, β-karotenu nebo lykopenu) ke vzorku plazmy. Pro každý analyt byly provedeny čtyři přídávky. Dosažené koncentrace byly v rozsahu hodnot kalibrační křivky stanovované látky.

$$R(\%) = \frac{x_i - x_0}{y} \cdot 100$$

(x_i – koncentrace vzorku přídatku i , x_0 – koncentrace vzorku nulového přídatku, y - přidané množství analytu)

3.5.7 Vyhodnocení

Koncentrace sledovaných vitaminů rozpustných v tucích byly určeny metodou kalibrační křivky (závislost koncentrace na poměru plochy píku vitaminu ku ploše píku vnitřního standardu).

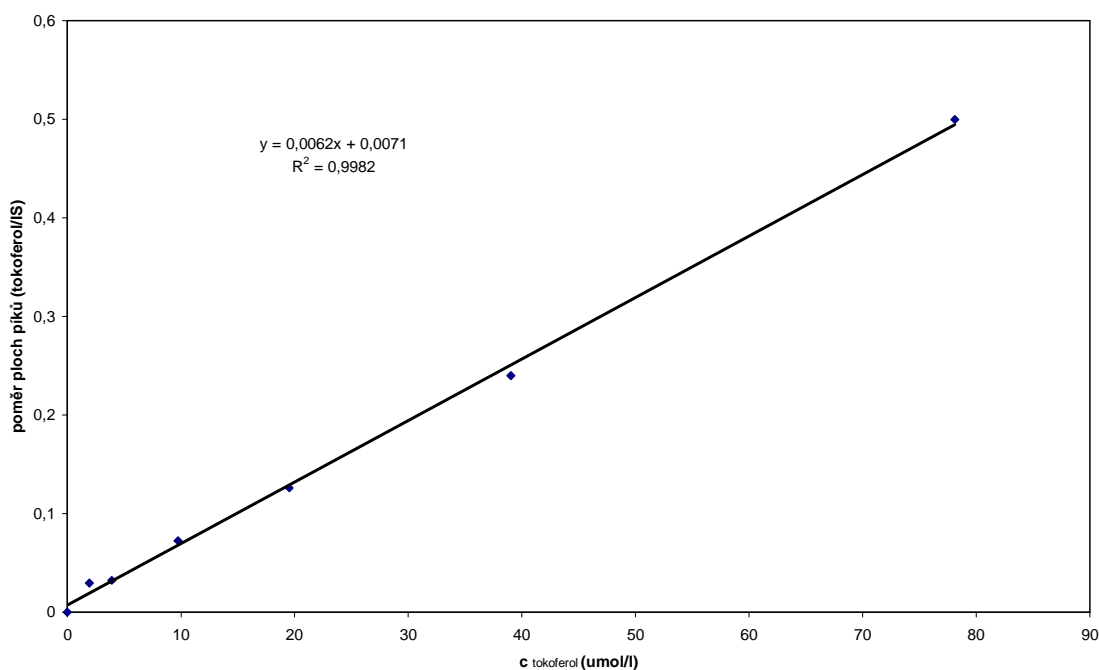
Identifikace byla provedena srovnáním referenčních časů se standardními roztoky nebo metodou přídatků.

4 VÝSLEDKY

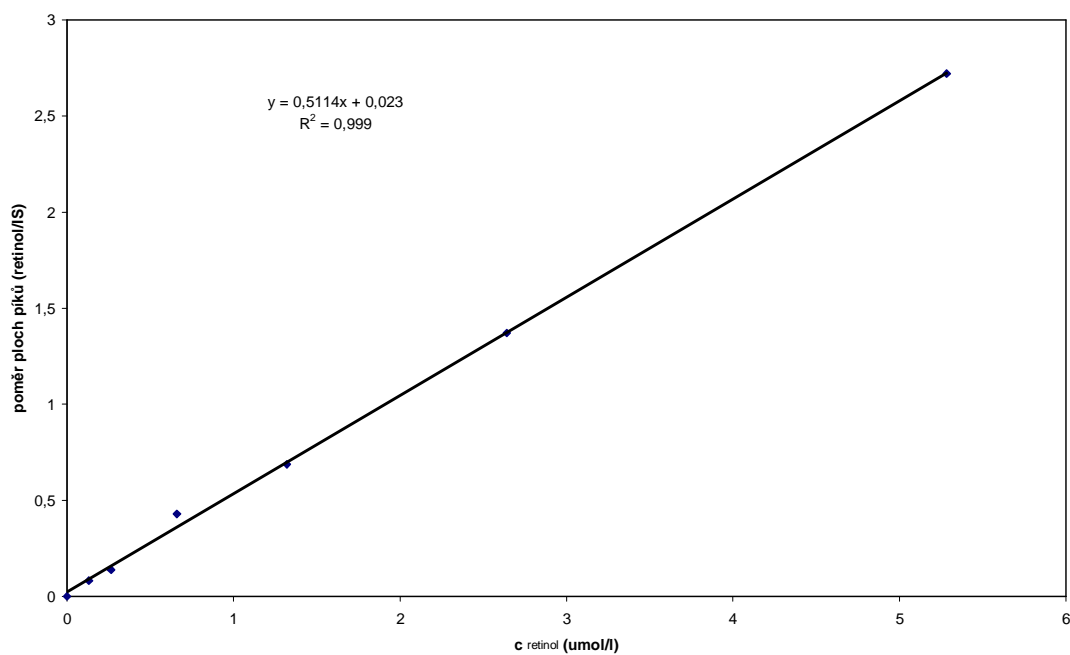
4.1 Kalibrační křivky

Kalibrační závislost poměru plochy píků α -tokoferolu k vnitřnímu standardu tokoferol acetátu je znázorněna na obrázku 6. Křivka vykazuje lineární průběh v rozsahu použitých koncentrací 0 – 78 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

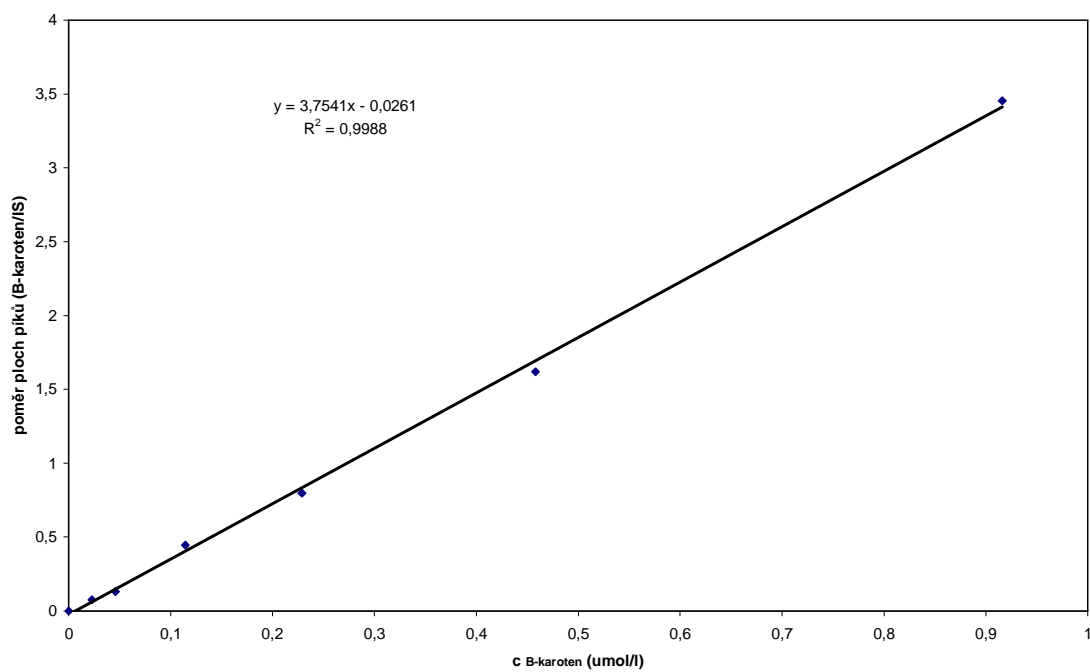
Kalibrační závislost poměru plochy píků retinolu, β -karotenu a lykopenu k vnitřnímu standardu retinyl acetátu je znázorněna na obrázku 7 - 9. Křivky na obr. 7 a 8 vykazují lineární průběh v rozsahu použitých koncentrací pro retinol 0 - 5,3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a pro β -karoten 0 – 0,9 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Na obrázku 9 je znázorněn lineární průběh v rozsahu použitých koncentrací lykopenu (0 - 0,33 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Na obrázku 10 je kalibrační závislost lykopenu s nelineárním rozložením vlivem posledního bodu kalibrace.



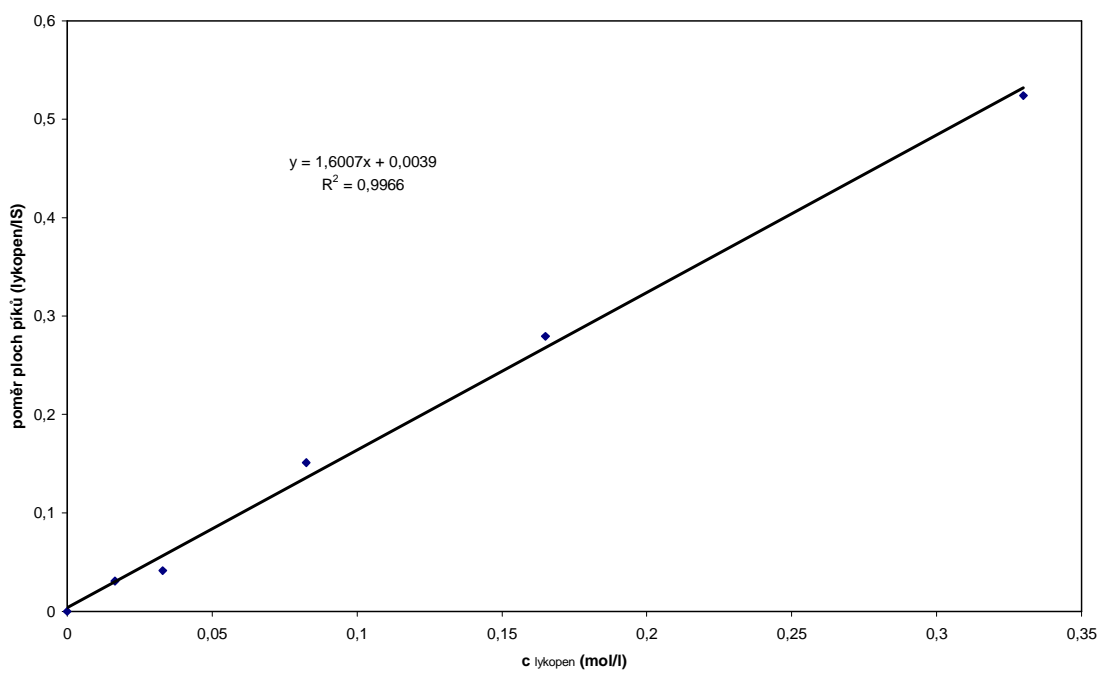
Obr. 6 Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu v plazmě



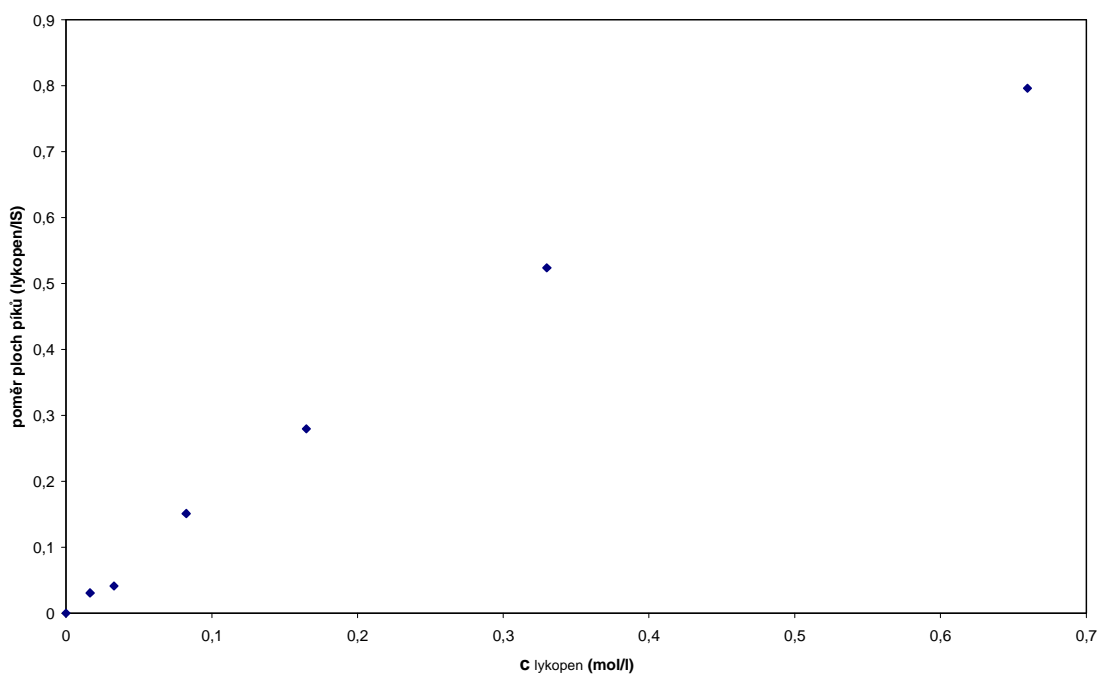
Obr. 7 Kalibrační křivka pro stanovení retinolu v plazmě



Obr. 8 Kalibrační křivka pro stanovení β -karotenu v plazmě



Obr. 9 Kalibrační křivka pro stanovení lykopenu v plazmě

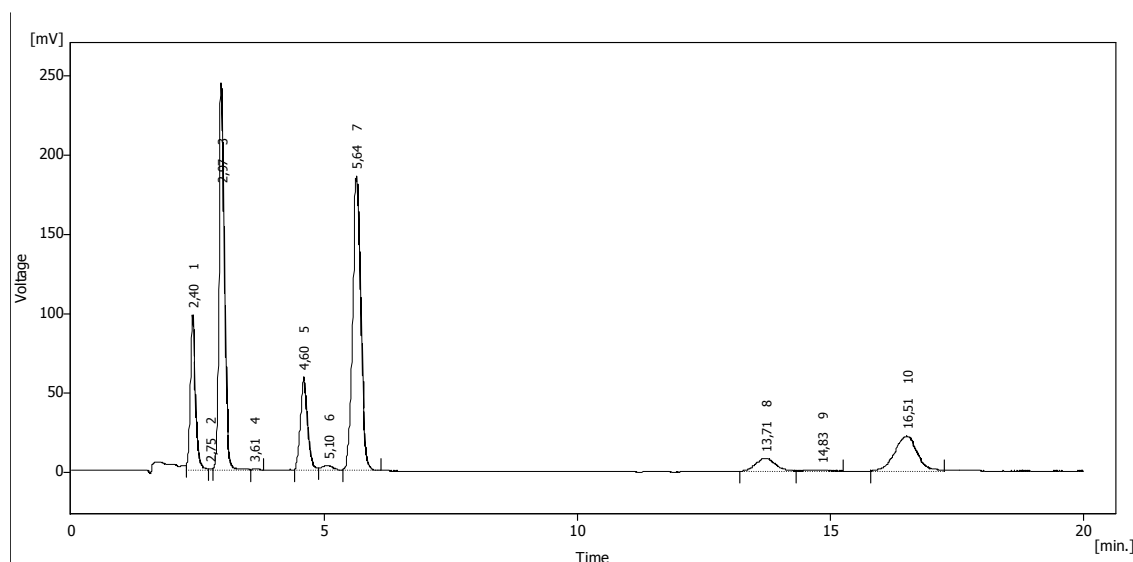


Obr. 10 Kalibrační křivka pro stanovení lykopenu v plazmě

4.2 Chromatografické záznamy

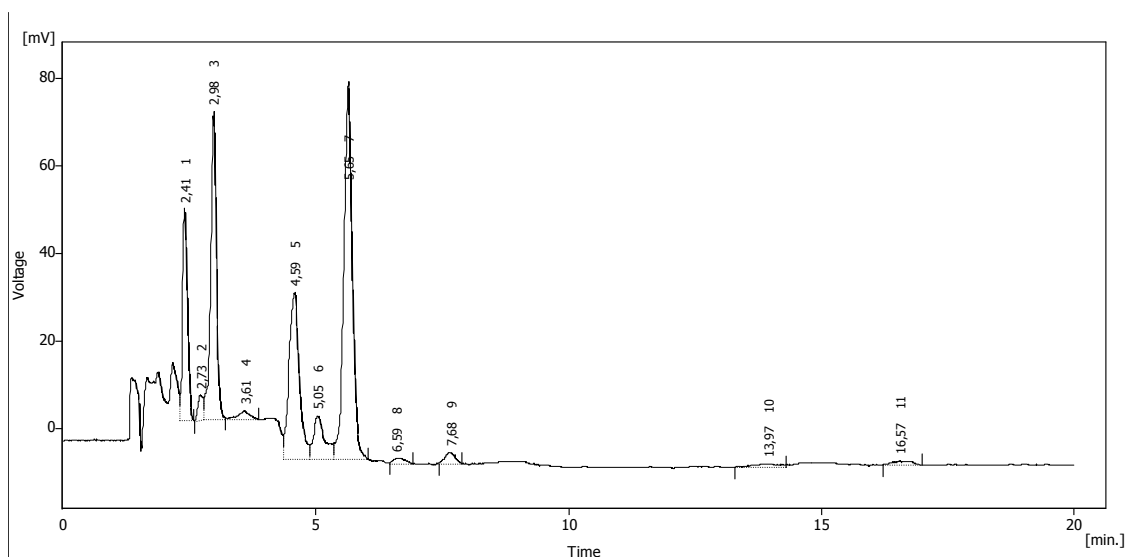
Proměřením připravených standardů a vzorků byly získány chromatografické záznamy. Obrázek 11 ukazuje chromatografický záznam směsné kalibrace o koncentraci retinolu $0,66 \mu\text{mol.l}^{-1}$, α -tokoferolu $9,82 \mu\text{mol.l}^{-1}$, β -karotenu $0,114 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a lykopenu $0,083 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

Na obrázku 12 a 13 je zobrazen záznam vzorku plazmy. U měřených vzorků byl problém s detekcí přítomného lykopenu. Obrázek 12 ukazuje přítomný lykopen ve vzorku, zatímco na obrázku 13 nebyl lykopen detekován.



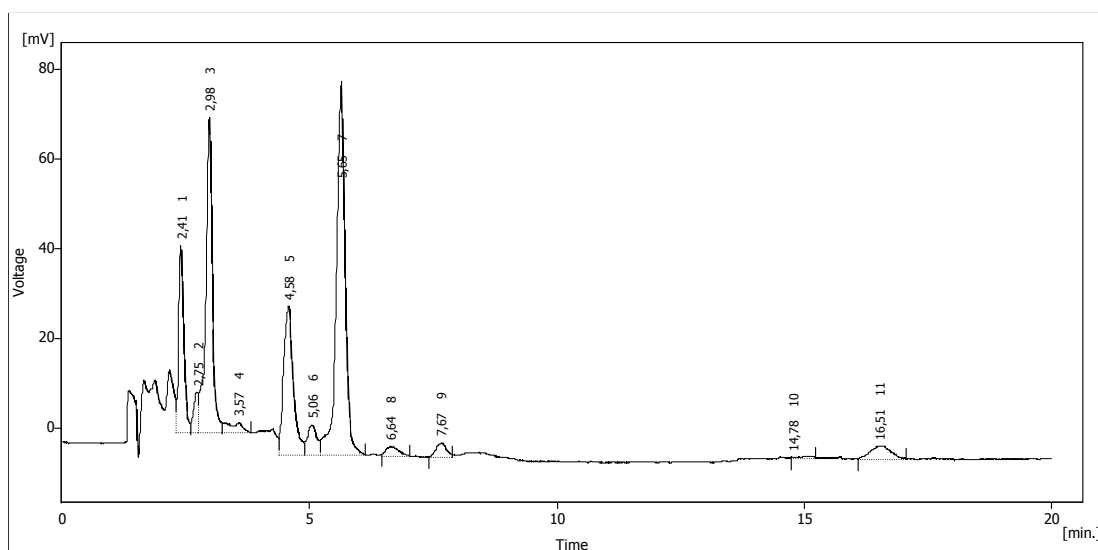
Obr. 11 Chromatografický záznam směsi standardů. 1 – retinol (2,40 min), 3 - retinyl acetát (2,97 min), 5 - α -tokoferol (4,60 min), 7 - tokoferol acetát (5,64 min), 8 – lykopen (13,71 min), 10 – β -karoten (16,51 min).

HPLC podmínky: průtok $0,8 \text{ ml.min}^{-1}$; $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce (0-4 min – 325 nm, 4-10 min – 292 nm, 10-15,50 min - 468 nm, 15,50-20 min - 450 nm).



Obr. 12 Chromatografický záznam vzorku. 1 – retinol (2,41 min), 3 - retinyl acetát (2,98 min), 5 - α -tokoferol (4,59 min), 7 - tokoferol acetát (5,65 min), 10 – lykopen (13,97 min), 11– β -karoten (16,57 min).

HPLC podmínky: stejné jako u obr. 11.



Obr. 13 Chromatografický záznam vzorku. 1 – retinol (2,41 min), 3 - retinyl acetát (2,98 min), 5 - α -tokoferol (4,58 min), 7 - tokoferol acetát (5,65 min), 11– β -karoten (16,51 min).

HPLC podmínky: stejné jako u obr. 11.

4.3 Analytické parametry

4.3.1 Přesnost v sérii

Přesnost stanovení α -tokoferolu, retinolu, β -karotenu a lykopenu v sérii (intra-assay) je uvedena v tabulce 3.

Tab. 3 Přesnost stanovení vitaminů rozpustných v tucích ve vzorku plazmy

Analyt	Počet měření	Průměrná c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Variační koeficient (CV%)
Retinol	10	1,27	5,7
Retinol	10	3,02	4,9
α -Tokoferol	10	22	3,1
α -Tokoferol	10	38	2,6
Lykopen	10	0,087	22,2
Lykopen	10	0,097	21,6
β -Karoten	10	0,27	6,8
β -Karoten	10	0,61	4,7

4.3.2 Správnost

Správnost stanovení vitaminů rozpustných v tucích byla otestována metodou standardních přídavek. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulkách 4 a 5.

U lykopenu byla zjištěna výtěžnost pod 50%.

Tab. 4 Správnost stanovení retinolu a α -tokoferolu

Retinol			α -Tokoferol		
Přídavek ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Naměřená c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)	Přídavek ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Naměřená c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)
0,00	1,21	-	0,0	18,3	-
0,27	1,47	95,8	5,0	22,7	88,0
0,54	1,76	103,1	10,0	27,1	88,0
0,81	1,92	88,8	15,0	32,7	96,0
1,07	2,22	94,1	20,0	37,1	94,0
Průměrná výtěžnost (%)	95,5		Průměrná výtěžnost (%)	91,5	
SD	5,89		SD	4,12	
CV (%)	6,17		CV (%)	4,51	

Tab. 5 Správnost stanovení β -karotenu

β-Karoten		
Přídavek ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Naměřená c ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Výtěžnost (%)
0,000	0,431	-
0,100	0,519	88,0
0,200	0,609	89,6
0,500	0,904	94,6
0,750	1,101	89,3
Průměrná výtěžnost (%)		90,4
SD		2,90
CV (%)		3,21

4.3 Distribuce hladin vitaminů rozpustných v tucích

Distribuce hladin jednotlivých vitaminů u vybraných skupin pacientů jsou znázorněné krabicovými grafy a diagramy rozptýlení v příloze 2-5.

4.3.1 Retinol

Koncentrace retinolu je u skupin PCI a P mírně vyšší než u skupiny N. U žen ve skupinách PCI a P je hladina retinolu vyšší než u mužů. Ve skupině N je jen nepatrný rozdíl.

Tab. 6 Koncentrace retinolu u skupiny PCI a další související parametry

	Skupina PCI		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,213	1,186	1,319
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,494	0,445	0,704
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,143	1,144	1,141
Rozsah	2,111	2,111	1,818
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	2,789	2,789	2,507
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,678	0,678	0,689
Rozdělení	Exponenciální	Exponenciální	Exponenciální
Počet (n)	24	19	5

Tab. 7 Koncentrace retinolu u skupiny P a další související parametry

	Skupina P		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,262	1,238	1,400
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,326	0,322	0,366
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,260	1,260	1,360
Rozsah	1,431	1,399	0,861
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,871	1,838	1,871
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,440	0,440	1,010
Rozdělení	Laplaceovo	Laplaceovo	Rovnoměrné
Počet (n)	27	23	4

Tab. 8 Koncentrace retinolu u skupiny N a další související parametry

	Skupina N		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,138	1,179	1,090
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,320	0,342	0,300
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,055	1,033	1,076
Rozsah	1,092	1,051	1,027
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,771	1,771	1,706
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,679	0,720	0,679
Rozdělení	Normální	Normální	Normální
Počet (n)	28	15	13

4.3.2 α -Tokoferolu

Hladina α -tokoferolu je ve skupině PCI nižší než ve skupinách P a N. Ve skupině N je vyšší hladina vitamínu E u žen, oproti tomu ve skupině PCI je vyšší hladina vitamínu E u mužů.

Tab. 9 Koncentrace α -tokoferolu u skupiny PCI a další související parametry

	Skupina PCI		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	22,11	22,47	20,71
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	4,42	4,72	2,71
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	21,90	22,103	21,20
Rozsah	20,49	20,49	9,10
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	34,85	34,85	25,40
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	14,36	14,36	16,31
Rozdělení	Normální	Normální	Normální
Počet (n)	45	36	9

Tab. 10 Koncentrace α -tokoferolu u skupiny P a další související parametry

	Skupina P		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	23,59	23,51	24,03
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	9,71	10,08	8,30
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	20,76	20,92	20,56
Rozsah	37,18	37,18	22,34
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	48,52	48,52	39,66
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	11,33	11,33	17,32
Rozdělení	Exponenciální	Exponenciální	Normální
Počet (n)	37	31	6

Tab. 11 Koncentrace α -tokoferolu u skupiny N a další související parametry

	Skupina N		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	23,67	23,19	24,09
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	5,72	5,79	5,75
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	23,27	22,73	23,31
Rozsah	28,46	21,66	28,46
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	42,38	35,70	42,38
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	13,92	14,04	13,92
Rozdělení	Laplaceovo	Normální	Laplaceovo
Počet (n)	47	22	25

4.3.3 β -Karoten

Hladina β -karotenu je vyšší u žen než u mužů.

Tab. 12 Koncentrace β -karotenu u skupiny PCI a další související parametry

	Skupina PCI		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,095	0,088	0,125
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,117	0,110	0,146
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,067	0,063	0,073
Rozsah	0,640	0,640	0,452
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,661	0,661	0,513
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,021	0,021	0,061
Rozdělení	Exponenciální	Exponenciální	Exponenciální
Počet (n)	45	36	9

Tab. 13 Koncentrace β -karotenu skupiny P a další související parametry

	Skupina P		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,106	0,087	0,207
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,120	0,087	0,208
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,057	0,055	0,165
Rozsah	0,564	0,449	0,556
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,588	0,473	0,558
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,025	0,025	0,033
Rozdělení	Exponenciální	Exponenciální	Normální
Počet (n)	37	31	6

Tab. 14 Koncentrace β -karotenu u skupiny N a další související parametry

	Skupina N		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,139	0,112	0,163
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,098	0,067	0,155
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,114	0,098	0,123
Rozsah	0,527	0,239	0,498
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,543	0,255	0,543
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,017	0,017	0,045
Rozdělení	Laplaceovo	Normální	Laplaceovo
Počet (n)	47	22	25

4.3.4 Lykopen

Z důvodů výskytů pouze jednoho zástupce žen ve skupinách PCI a P, nelze dostatečně posoudit hladiny lykopenu u mužů a žen v těchto skupinách.

Ve skupině N je vyšší koncentrace lykopenu u mužů.

Tab. 15 Koncentrace lykopenu u skupiny PCI a další související parametry

	Skupina PCI		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,022	0,025	0,001
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,013	0,010	-
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,022	0,023	0,001
Rozsah	0,039	0,029	-
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,040	0,040	0,001
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,001	0,011	0,001
Rozdělení	Rovnoměrné	Rovnoměrné	-
Počet (n)	9	8	1

Tab. 16 Koncentrace lykopenu u skupiny P a další související parametry

	Skupina P		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,038	0,039	0,030
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,023	0,024	-
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,033	0,033	0,030
Rozsah	0,066	0,066	-
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,071	0,071	0,030
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,005	0,005	0,030
Rozdělení	Normální	Normální	-
Počet (n)	10	9	1

Tab. 17 Koncentrace lykopenu u skupiny N a další související parametry

	Skupina N		
	Obě pohlaví	Muži	Ženy
Průměr ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,032	0,039	0,027
Směr. odch. ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,018	0,009	0,020
Medián ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,033	0,040	0,018
Rozsah	0,054	0,020	0,054
Maximum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,061	0,049	0,061
Minimum ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	0,007	0,029	0,007
Rozdělení	Normální	Rovnoměrné	Normální
Počet (n)	14	5	9

4.4 Korelace hladinami jednotlivých vitaminů a věkem

Korelaci mezi hladinami jednotlivých vitaminů a věkem u skupin PCI, P a N (u obou pohlaví, u mužů a žen) byla zjištěna pomocí Spearmanovy korelace.

Byla nalezena statisticky významná závislost u retinolu ve skupině N ($n = 28$, $P = 0,0098$, $R = -0,480$) a u lykopenu: ve skupině všech účastníků ($n = 32$, $P = 0,013$, $R = -0,436$), v P skupině obou pohlaví ($n = 10$, $P = 0,013$, $R = -0,743$) a v P skupině u mužů ($n = 9$, $P = 0,0108$, $R = -0,775$). Ve všech těchto skupinách se vzrůstajícím věkem klesá hodnota koncentrace daného vitaminu (příloha 6-9).

Tab 18. Korelační závislost α -tokoferolu a retinolu na věku

Skupina	α -Tokoferol			Retinol		
	n	R	P	n	R	P
Všechny skupiny						
Obě pohlaví	129	-0,109	0,217	79	-0,122	0,282
Muži	89	-0,109	0,306	57	-0,14	0,289
Ženy	40	-0,134	0,408	22	-0,0609	0,786
PCI skupina						
Obě pohlaví	45	-0,164	0,208	24	-0,206	0,33
Muži	36	-0,119	0,486	19	-0,214	0,373
Ženy	9	-0,319	0,381	5	0,158	0,783
P skupina						
Obě pohlaví	37	-0,154	0,359	27	0,306	0,119
Muži	31	-0,132	0,476	23	0,173	0,425
Ženy	6	-0,543	0,297	4	0,8	0,333
N skupina						
Obě pohlaví	47	-0,0932	0,531	28	-0,48	0,0098
Muži	22	-0,0701	0,751	15	-0,406	0,127
Ženy	25	-0,0997	0,63	13	-0,431	0,137

Tab 19. Korelační závislost lykopenu a β -karotenu na věku

Skupina	n	Lykopen		n	β -Karoten	
		R	P		R	P
Všechny skupiny						
Obě pohlaví	32	-0,436	0,013	129	0,0375	0,673
Muži	22	-0,4	0,064	89	0,0532	0,62
Ženy	10	-0,375	0,275	40	-0,203	0,208
PCI						
Obě pohlaví	9	-0,567	0,0988	45	0,0582	0,702
Muži	8	-0,405	0,29	36	0,0426	0,804
Ženy	1	1	1	9	-0,0588	0,844
P						
Obě pohlaví	10	-0,743	0,0108	37	0,101	0,548
Muži	9	-0,755	0,0158	31	0,129	0,485
Ženy	1	1	1	6	0,143	0,803
N						
Obě pohlaví	14	-0,312	0,271	47	0	1
Muži	5	0,1	0,95	22	0,16	0,472
Ženy	9	-0,373	0,38	25	-0,3	0,143

4.5 Porovnání hladin jednotlivých vitaminů mezi skupinami

Porovnávání hladin vybraných vitaminů mezi skupinou PCI nebo P se skupinou N bylo provedeno pomocí t-testu nebo Mann-Whitneyho testu.

Ve skupině PCI u obou pohlaví ($P = <0,001$), ve skupině PCI u mužů ($P = 0,022$), ve skupině P u obou pohlaví ($P = 0,003$) a ve skupině P u mužů ($P = 0,034$) byla hladina β -karotenu nižší než ve skupině N.

Ve skupině PCI u mužů byla pozorována i nižší hladina lykopenu než ve skupině N.

Tab. 20 Porovnání hladin retinolu

Skupina	Koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Pravděpodobnost (P)
PCI x N		
Obě pohlaví	1,21 \pm 0,49 (n = 25) vs. 1,138 \pm 0,32 (n = 29)	0,905
Muži	1,19 \pm 0,45 (n = 20) vs. 1,18 \pm 0,34 (n = 16)	0,965
Ženy	1,32 \pm 0,70 (n = 5) vs. 1,09 \pm 0,30 (n = 13)	0,334
P x N		
Obě pohlaví	1,26 \pm 0,33 (n = 28) vs. 1,14 \pm 0,32 (n = 29)	0,161
Muži	1,24 \pm 0,32 (n = 24) vs. 1,18 \pm 0,34 (n = 16)	0,596
Ženy	1,40 \pm 0,37 (n = 4) vs. 1,09 \pm 0,30 (n = 13)	0,105

Tab. 21 Porovnání hladin α -tokoferolu

Skupina	Koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Pravděpodobnost (P)
PCI x N		
Obě pohlaví	22,11 \pm 4,42 (n = 45) vs. 23,67 \pm 5,72 (n = 47)	0,150
Muži	22,47 \pm 4,72 (n = 36) vs. 23,19 \pm 5,80 (n = 22)	0,605
Ženy	20,708 \pm 2,71 (n = 9) vs. 24,09 \pm 5,75 (n = 25)	0,073
P x N		
Obě pohlaví	23,59 \pm 9,71 (n = 40) vs. 23,67 \pm 5,72 (n = 47)	0,163
Muži	23,51 \pm 10,08 (n = 31) vs. 23,19 \pm 5,80 (n = 22)	0,432
Ženy	24,03 \pm 8,30 (n = 9) vs. 24,09 \pm 5,75 (n = 25)	0,984

Tab. 22 Porovnání hladin β -karotenu

Skupina	Koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Pravděpodobnost (P)
PCI x N		
Obě pohlaví	0,095 \pm 0,117 (n = 45) vs. 0,139 \pm 0,098 (n = 47)	<0,001
Muži	0,088 \pm 0,110 (n = 36) vs. 0,112 \pm 0,067 (n = 22)	0,022
Ženy	0,125 \pm 0,146 (n = 9) vs. 0,163 \pm 0,115 (n = 25)	0,093
P x N		
Obě pohlaví	0,106 \pm 0,120 (n = 40) vs. 0,139 \pm 0,098 (n = 47)	0,003
Muži	0,087 \pm 0,087 (n = 31) vs. 0,112 \pm 0,067 (n = 22)	0,034
Ženy	0,207 \pm 0,208 (n = 9) vs. 0,163 \pm 0,115 (n = 25)	0,980

Tab. 23. Porovnání hladin lykopenu

Skupina	Koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	Pravděpodobnost (P)
PCI x N		
Obě pohlaví	0,022 \pm 0,013 (n = 10) vs. 0,032 \pm 0,017 (n = 15)	0,162
Muži	0,025 \pm 0,010 (n = 9) vs. 0,039 \pm 0,009 (n = 6)	0,028
P x N		
Obě pohlaví	0,038 \pm 0,023 (n = 11) vs. 0,032 \pm 0,017 (n = 15)	0,426
Muži	0,039 \pm 0,024 (n = 10) vs. 0,039 \pm 0,009 (n = 6)	1

5 DISKUSE

Stanovení vitaminů rozpustných v tucích bylo provedeno HPLC metodou na obrácených fázích.

Vlnové délky pro stanovení byly určeny proměřením jednotlivých roztoků standardů na spektrofotometru. Získaná absorpční maxima látek (Příloha 10-13) byla porovnána s užívanými vlnovými délkami při UV/VIS stanovení. Použitá maxima dosahovala hodnot - pro α -tokoferol 292 nm, retinol 325 nm, β -karoten 450 nm a lykopen 468 nm.

V rámci této práce, stanovení vitaminu rozpustných v tucích, byla původně snaha i o stanovení luteinu, který je detekován při 450 nm.

Vlivem výběru metody analýzy na obrácených fázích byl lutein, jež je polárnějším karotenoidem než β -karoten a lykopen, eluován těsně za retinyl acetátem a před α -tokoferolem. Neboť každá z těchto látek má své absorpční maximum při jiné vlnové délce, vyskytl se problém při přepínání detektoru z vlnové délky 325 nm, detekující retinol a jeho vnitřní standard retinyl acetát, na 450 nm pro lutein. Nebyl zde dostatečný prostor k přepnutí vlnových délek mezi právě se eluujícími látkami. Při stanovení vzorku plazmy (příloha 14) došlo k přepnutí vlnových délek ještě v době eluování retinyl acetátu, a tedy detekce luteinu byla znemožněna.

Byla zvažována možnost výběru jiného vnitřního standardu místo retinyl acetátu, který byl zvolen i jako vnitřní standard stanovovaných karotenoidů. Naše pozornost byla zaměřena na dva jiné vnitřní standardy běžně používané při stanovení karotenoidů.

Prvně jsme testovali retinyl palmitát. V blízkosti retinyl palmitátu za daných podmínek neeluovala žádná interferující látka ani námi stanovovaný analyt. Za této situace byla dostatečně dlouhá doba na změnu vlnové délky během analýzy.

Problémem však je, že se tato látka běžně vyskytuje v lidské plazmě (viz příloha 15,16). Naše pozorování je v souladu s jinými publikovanými údaji (43).

Z tohoto důvodu nemohl být retinyl palmitát použit jako vnitřní standard.

Stejný problém se vyskytl i u β -apo-8'-karotenalu (viz. Příloha 17, 18). β -apo-8'-Karotenal pravděpodobně vzniká při degradaci molekuly β -karotenu (44, 45). Navíc se eluoval v blízkosti α -tokoferolu, a tak opět nastal problém v přepínání

vlnových délek. Námí používaný detektor je v tomto ohledu dosti pomalý v porovnání s modernějšími spektrofotometrickými detektory. Nejlepší by bylo použití detektoru s diodovým polem.

Uvažovali jsme ještě nad jedním možným vnitřním standardem, echinenonem (32). Jedná se o vhodný vnitřní standard, který se za normálních okolností v lidské plazmě nevyskytuje. Bohužel je tato látka komerčně nedostupná.

Ze zjištěných poznatků vyplynulo, že nejvhodnějším vnitřním standardem je za těchto podmínek retinyl acetát. Z důvodu těsné eluce retinyl acetátu a luteinu bylo stanovení luteinu nemožné.

Vhodným vnitřním standardem pro α -tokoferol byl zvolen tokoferol acetát, který eluoval až za α -tokoferolem, navíc oba analyty byly monitorovány při stejné vlnové délce (292 nm).

Proměření vzorků dárců a pacientů s kardiovaskulárním onemocněním byly získány koncentrace jednotlivých analytů. Porovnáním získaných naměřených hodnot stanovovaných látek všech účastníků s hodnotami uváděnými v publikacích (4, 46) vyplývá, že získané koncentrace α -tokoferolu, β -karotenu a retinolu, stejně tak lykopenu jsou nižší než publikované. Může to být ovlivněno životosprávou účastníků této studie.

All-*trans*-lykopen je látkou citlivou na UV záření a oxidaci, jejichž působením se přeměňuje na *cis* izomery. Proto jsme se při přípravě vzorku snažili zabránit vlivu slunečního záření užitím tmavých mikrozkrumavek a prací v prostředí bez přímého slunečního záření.

Vyzkoušeli jsme i butylovaný hydroxytoluen (BTH), látku, která je často užívána v publikovaných metodách (29) jako prostředek zabránění izomerace. Přidává se do extrakčního roztoku a popř. i mobilní fáze.

Připravili jsme si 0,1% roztok BTH v hexanu, jež byl poté užit při extrakci analytů. Při HPLC analýze takto připravených vzorků jsme zjistili přítomnost neznámých píků. Z důvodu možného ovlivnění stanovení námí vybraných analytů nebylo BTH dále používán.

Z důvodu nestability lykopenu nebylo možno určit správnost metody pomocí standardních přídavek. Výťažnost se pohybovala pod 50%.

Sledování vlivu věku na hladinách vitaminů v jednotlivých skupinách (u obou pohlaví, mužů a žen) jsme zjistili pomocí Spearmanovy korelace statisticky významnou závislost u retinolu ve skupině N ($n = 28$, $P = 0,0098$, $R = -0,480$). Z hodnoty korelačního koeficientu vyplývá, že koncentrace klesá se vzrůstajícím věkem (příloha 6). U lykopenu jsme našli statisticky významnou závislost ve skupině všech účastníků ($n = 32$, $P = 0,013$, $R = -0,436$), v P skupině obou pohlaví ($n = 10$, $P = 0,013$, $R = -0,743$) a v P skupině mužů ($n = 9$, $P = 0,0108$, $R = -0,775$). Ve všech těchto skupinách, stejně jako u retinolu v N skupině, se vzrůstajícím věkem klesá hodnota koncentrace lykopenu (příloha 7-9).

Porovnáním hladin vybraných vitaminů skupiny PCI nebo P se skupinou N pomocí t-testu nebo Mann-Whitneyho testu byla zjištěna nižší koncentrace β -karotenu ve skupině PCI u obou pohlaví ($P = <0,001$; $0,0951 \pm 0,117$ ($n = 45$) vs. $0,131 \pm 0,0980$ ($n = 47$)), ve skupině PCI u mužů ($P = 0,022$; $0,088 \pm 0,110$ ($n = 36$) vs. $0,112 \pm 0,067$ ($n = 22$)), ve skupině P u obou pohlaví ($P = 0,003$; $0,106 \pm 0,120$ ($n = 40$) vs. $0,139 \pm 0,098$ ($n = 47$)) a ve skupině P u mužů ($P = 0,034$; $0,087 \pm 0,087$ ($n = 31$) vs. $0,112 \pm 0,067$ ($n = 22$)).

Také byla nalezena nižší hladina lykopenu ve skupině PCI u mužů ($P = 0,028$; $0,025 \pm 0,010$ ($n = 9$) vs. $0,039 \pm 0,009$ ($n = 6$)).

6 ZÁVĚR

Cílem této metody bylo stanovení vitaminů rozpustných v tucích (α -tokoferolu, retinolu, β -karotenu a lykopenu) v plazmě pacientů s kardiovaskulárním onemocněním a u dobrovolných dárců krve. Celkem bylo analyzováno 129 vzorků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí.

Byla nalezena statisticky významná závislost hladiny lykopenu ku věku ve skupině všech účastníků, ve skupině P u obou pohlaví a u mužů. Statisticky významná závislost koncentrace retinolu na věku byla nalezena i v N skupině. Ve všech těchto skupinách se ukázalo, že s vzrůstajícím věkem klesá hladina výše zmíněných vitaminů.

Porovnáváním hladin vybraných vitaminů mezi skupinou PCI nebo P se skupinou N byla zjištěna nižší koncentrace β -karotenu ve skupině PCI u obou pohlaví, ve skupině PCI u mužů, ve skupině P u obou pohlaví a ve skupině P u mužů.

Také byla nalezena nižší hladina lykopenu ve skupině PCI u mužů.

7 LITERATURA

- (1) Stahl W., Sies H.: Antioxidant activity of carotenoids. *Mol Aspects Med* 2003; 24(6): 345-351.
- (2) Hlúbik P., Opltalová L.: Vitaminy. *Grada* 2004: 19-41, 55-64, 169-178.
- (3) Edem D.O.: Vitamin A: A Review. *Asian J Clin Nutr* 2009; 1(1): 65-82.
- (4) Ortega H., Coperías J.L., Castilla P., Gómez-Coronado D., Lasunción M.A.: Liquid chromatographic method for the simultaneous determination of different lipid-soluble antioxidants in human plasma and low-density lipoproteins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 803(2): 249-255.
- (5) Sen C.K., Khanna S., Roy S.: Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sci* 2006; 78(18): 2088-2098.
- (6) Kaul N., Devaraj S., Jialal I.: Alpha-tocopherol and atherosclerosis. *Exp Biol Med* 2001; 226(1): 5-12.
- (7) Stahl W., van den Berg H., Arthur J., Bast A., Dainty J. a kol.: Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 2002; 23(1-3): 39-100.
- (8) Aust O., Sies H., Stahl W., Polidori M.C.: Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. *J Chromatogr A* 2001; 936(1-2): 83-93.
- (9) Paiva S.A., Russell R.M.: Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr* 1999; 18(5): 426-433.
- (10) Krinsky N.I., Johnson E.J.: Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26(6): 459-516.
- (11) Clinton S.K.: Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1998, 56(2): 35-51.
- (12) Rao A.V., Agarwal S.: Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *J Am Coll Nutr* 2000; 19(5): 563-569.
- (13) Arab L., Steck S.: Lycopene and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(6): 1691S-1695S.
- (14) Štípek S. a kol.: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. *Grada* 2000: 54-62.

-
- (15) Traber M.G., Atkinson J.: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(1): 4-15.
 - (16) Racek J.: Klinická biochemie. *Galén* 1999: 135.
 - (17) Sies H., Stahl W.: Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(6):1315S-1321S.
 - (18) Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.: Harperova biochemie. *Nakladatelství H&H* 2001: 621, 623-624.
 - (19) Patrick L.: Beta-carotene: the controversy continues. *Altern Med Rev* 2000; 5(6): 530-545.
 - (20) Furr H.C.: Analysis of retinoids and carotenoids: problems resolved and unsolved. *J Nutr* 2004; 134(1): 281S-285S.
 - (21) Hata T.R., Scholz T.A., Ermakov I.V., McClane R.W., Khachik F.: Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin. *J Invest Dermatol* 2000; 115(3): 441-448.
 - (22) Klouda P.: Moderní analytické metody. *Nakladatelství Pavel Klouda* 2003: 26-30, 90-91.
 - (23) Rajendran V., Pu Y.S., Chen B.H.: An improved HPLC method for determination of carotenoids in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 824(1-2): 99-106.
 - (24) Yeum K.J., Booth S.L., Sadowski J.A., Liu C., Tang G. a kol.: Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr* 1996; 64(4):594-602.
 - (25) Poole CF., Schuette SA.: Contemporary practice of chromatography. *Elsevier Science Publisher* 1984: 452.
 - (26) Talwar D., Ha T.K., Cooney J., Brownlee C., O'Reilly D.S.: A routine method for the simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and five carotenoids in human plasma by reverse phase HPLC. *Clin Chim Acta* 1998; 270(2): 85-100.
 - (27) Lee B.L., New A.L., Ong C.N.: Simultaneous determination of tocotrienols, tocopherols, retinol, and major carotenoids in human plasma. *Clin Chem* 2003; 49(12): 2056-2066.

-
- (28) Abahusain M.A., Wright J., Dickerson J.W., el-Hazmi M.A., Aboul Enein H.Y.: Determination of retinol, alpha-tocopherol, alpha- and beta-carotene by direct extraction of human serum using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 1998; 12(2): 89-93.
- (29) Karppi J., Nurmi T., Olmedilla-Alonso B., Granado-Lorencio F., Nyssönen K.: Simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and six carotenoids in human plasma by using an isocratic reversed-phase HPLC method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 867(2): 226-232.
- (30) Schäfer Elinder L., Walldius G.: Simultaneous measurement of serum probucol and lipid-soluble antioxidants. *J Lipid Res* 1992; 33(1): 131-137.
- (31) Nierenberg D.W., Nann S.L.: A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 1992; 56(2): 417-426.
- (32) Zaman Z., Fielden P., Frost P.G.: Simultaneous determination of vitamins A and E and carotenoids in plasma by reversed-phase HPLC in elderly and younger subjects. *Clin Chem* 1993; 39(11): 2229-2234.
- (33) Zeng S., Furr H.C., Olson J.A.: Metabolism of carotenoid analogs in humans. *Am J Clin Nutr* 1992; 56(2): 433-439.
- (34) Sowell A.L., Huff D.L., Yeager P.R., Caudill S.P., Gunter E.W.: Retinol, alpha-tocopherol, lutein/zeaxanthin, beta-cryptoxanthin, lycopene, alpha-carotene, trans-beta-carotene, and four retinyl esters in serum determined simultaneously by reversed-phase HPLC with multiwavelength detection. *Clin Chem* 1994; 40(3): 411-416.
- (35) MacCrehan W.A., Schönberger E.: Determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid chromatography with absorbance and electrochemical detection. *Clin Chem* 1987; 33(9): 1585-1592.
- (36) Vertzoni M.V., Reppas C., Archontaki H.A.: Optimized determination of lycopene in canine plasma using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005; 819(1): 149-154.
- (37) Zýka J. a kol.: Analytická příručka. *Nakladatelství technické literatury* 1988; díl 1: 190-192.

- (38) Taibi G., Nicotra C.M.: Development and validation of a fast and sensitive chromatographic assay for all-trans-retinol and tocopherols in human serum and plasma using liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 780(2): 261-267.
- (39) Podda M., Weber C., Traber M.G., Packer L.: Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *J Lipid Res* 1996; 37(4): 893-901.
- (40) Finckh B., Kontush A., Commentz J., Hübner C., Burdelski M. a kol.: Monitoring of ubiquinol-10, ubiquinone-10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma microsamples using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection. *Anal Biochem* 1995; 232(2): 210-216.
- (41) Andreoli R., Manini P., Poli D., Bergamaschi E., Mutti A. a kol.: Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378(4): 987-994.
- (42) Bierer T.L., Merchen N.R., Erdman J.W. Jr.: Comparative absorption and transport of five common carotenoids in preruminant calves. *J Nutr* 1995; 125(6): 1569-1577.
- (43) van Vliet T., Schreurs W.H., van den Berg H.: Intestinal beta-carotene absorption and cleavage in men: response of beta-carotene and retinyl esters in the triglyceride-rich lipoprotein fraction after a single oral dose of beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1995; 62(1): 110-116.
- (44) Ho C.C., de Moura F.F., Kim S.H., Clifford A.J.: Excentral cleavage of beta-carotene in vivo in a healthy man. *Am J Clin Nutr* 2007;85(3): 770-777.
- (45) Krinsky N.I., Wang X.D., Tang G., Russell R.M.: Mechanism of carotenoid cleavage to retinoids. *Ann NY Acad Sci* 1993; 691: 167-176.
- (46) Ruiz Rejón F., Martín-Peña G., Granado F., Ruiz-Galiana J., Blanco I. a kol.: Plasma status of retinol, alpha- and gamma-tocopherols, and main carotenoids to first myocardial infarction: case control and follow-up study. *Nutrition* 2002; 18(1): 26-31.

PŘÍLOHY

Zápis ze schůze etické komise při Krajské nemocnici Pardubice

ze dne 4. 11. 2005 (15.00 h)

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., doc. MUDr. Viktor Chrobok, CSc., MUDr. David Stuchlík,
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc., Mgr. Jaroslav Procházka, Ing. Petr Pražák,
JUDr. Josef Rokos, MUDr. Zuzana Grofová,
Omluven: MUDr. Vladimír Motyčka, MUDr. Tomáš Sýkora, MUDr. Marek Sychra,

Schůzi zahájil a řídil doc. MUDr. Josef Hájek, CSc., předseda etické komise (EK):

- Pharm.Dr. Jiří Skalický, primář OKBD KNP, předložil členům EK žádost o souhlas s použitím biologického materiálu ke stanovení referenčních mezí a ověření metodik u vybraných skupin pacientů. Tato výzkumná práce (je zaměřena na sledování vlivu volných radikálů na základní biochemické struktury, zejména lipidy a proteiny, s cílem zjistit význam jednotlivých stanovení pro běžnou diagnostiku) nemá komerční charakter. Výsledky jsou určeny pro potřeby OKBD a Univerzity Pardubice s cílem získání informací pro odbornou veřejnost včetně publikační činnosti.
Členové EK předloženou žádost jednomyslně schválili.

Předběžný termín příští schůze etické komise: **2. 12. 2005**

V Pardubicích 3. 11. 2005

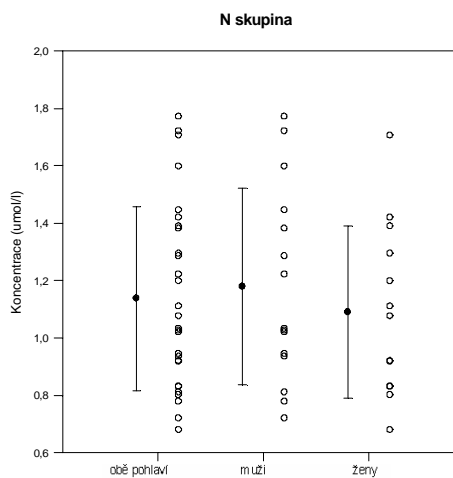
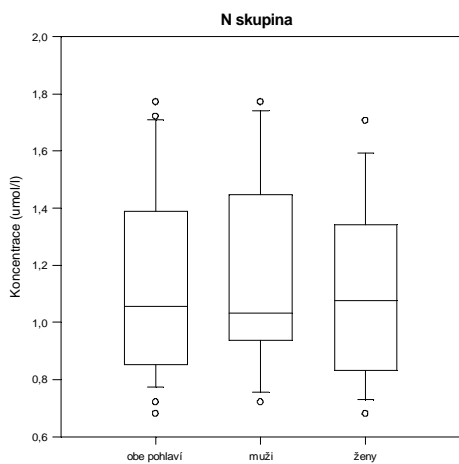
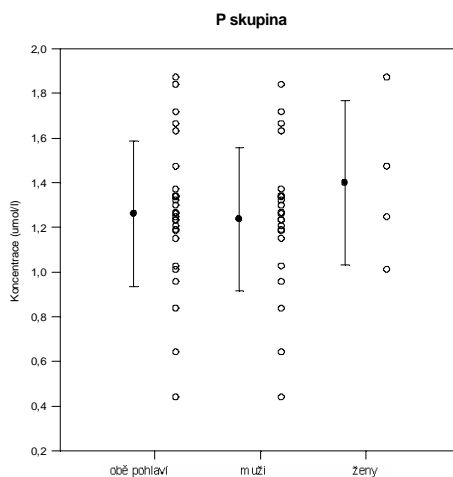
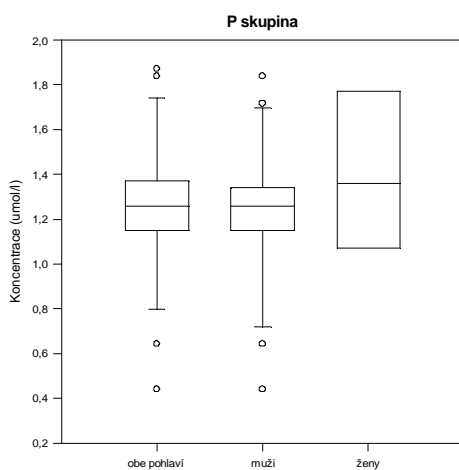
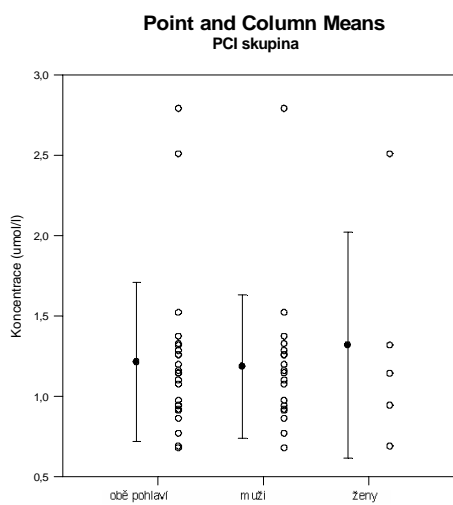
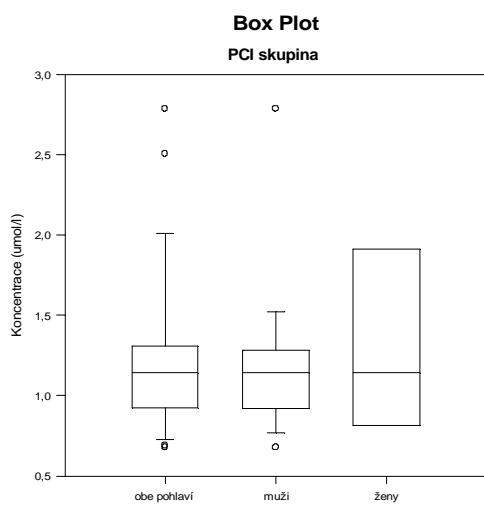
Zapsala: Faiklová

Etická komise
při Krajské nemocnici Pardubice
Květácká 44
532 03 Pardubice

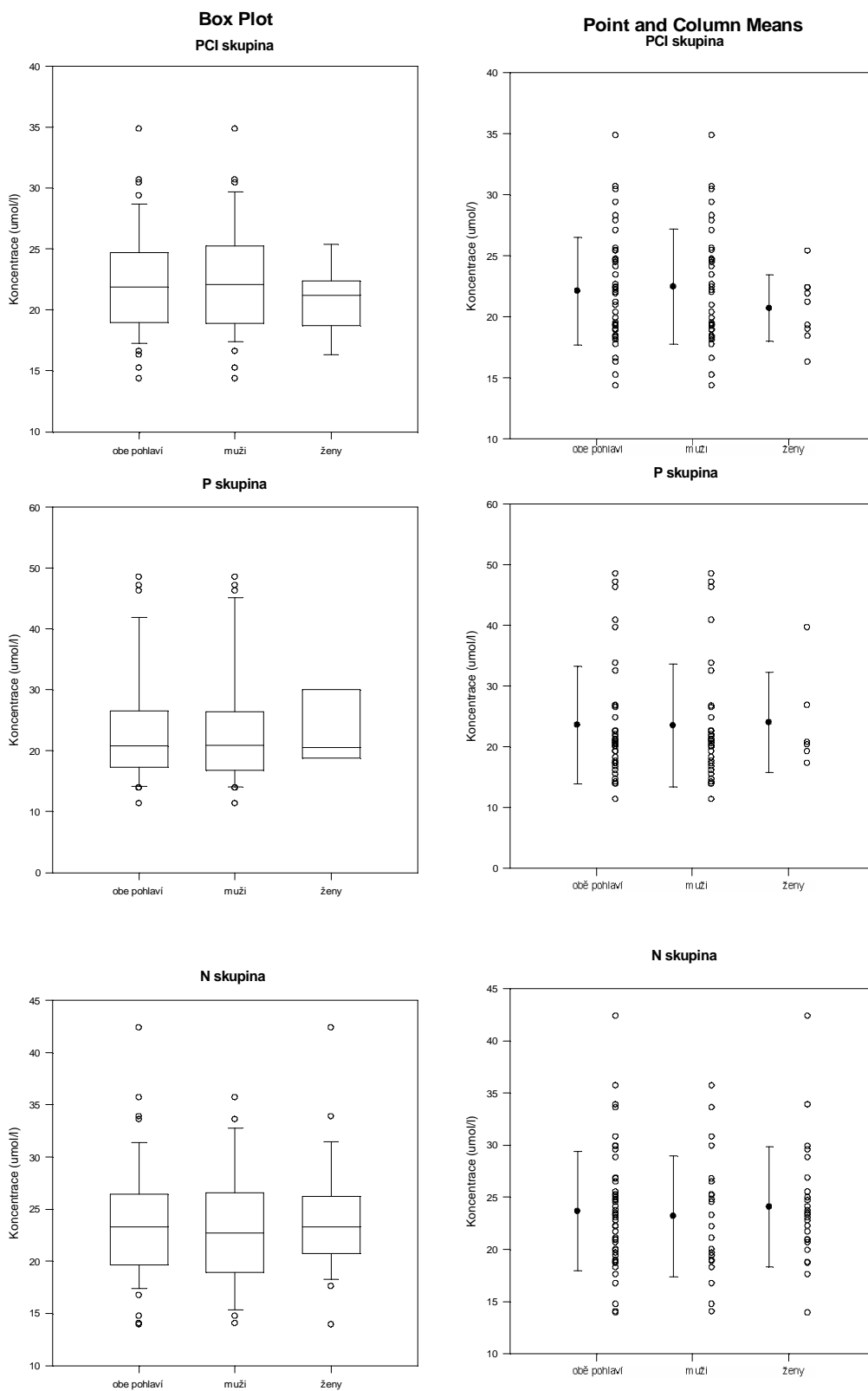
MUDr. Josef Hájek, CSc.
předseda Etické komise
při Krajské nemocnici Pardubice

Příloha 1: Schválení etické komise Nemocnice Pardubice

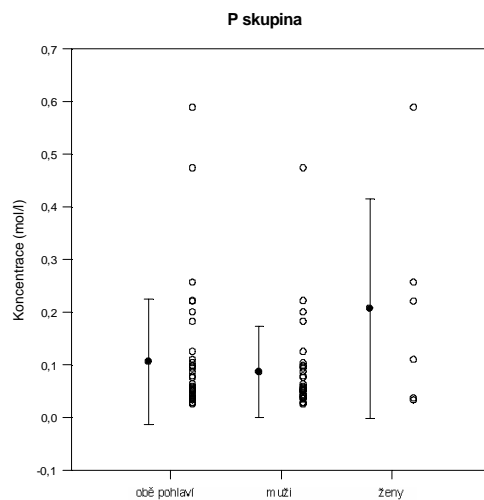
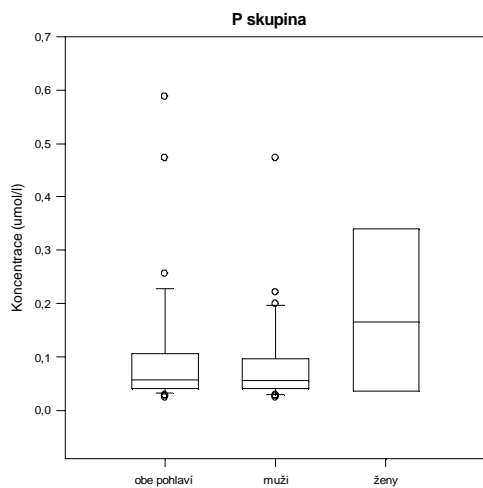
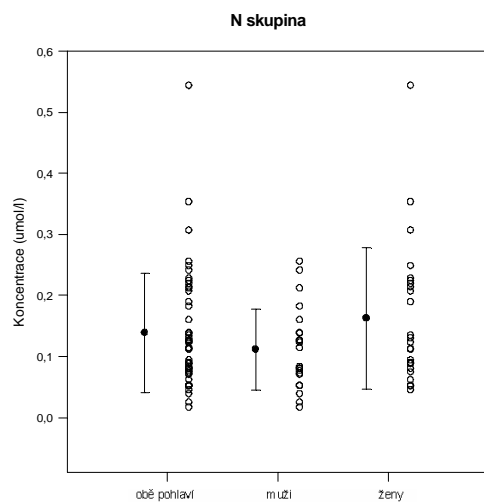
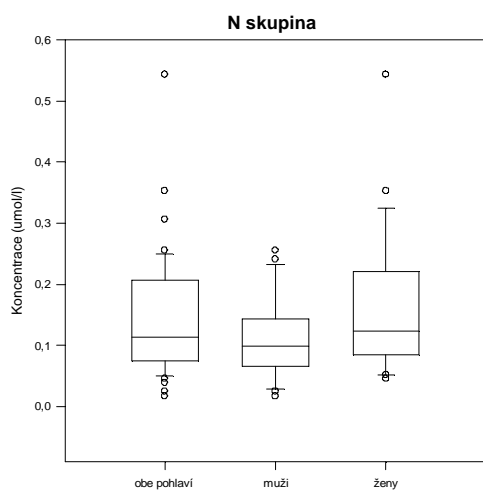
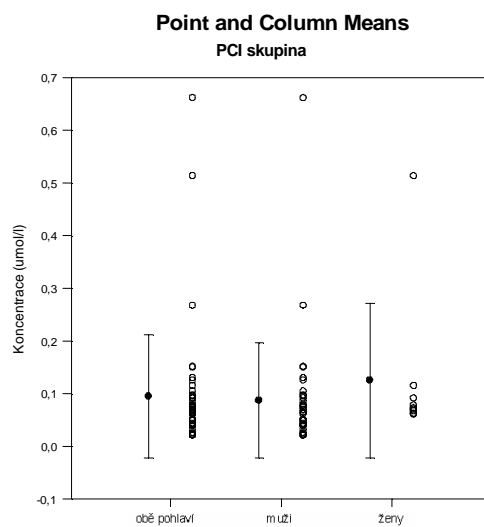
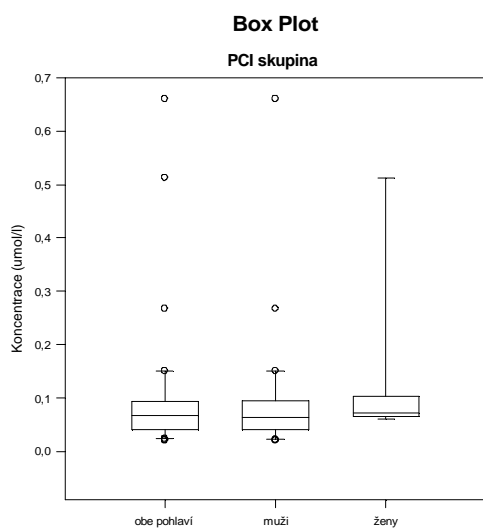
Příloha 2: Hladiny retinolu u mužů, žen a obou pohlaví ve skupině PCI, P a N, znázorněné krabicovými grafy a diagramy rozptýlení.



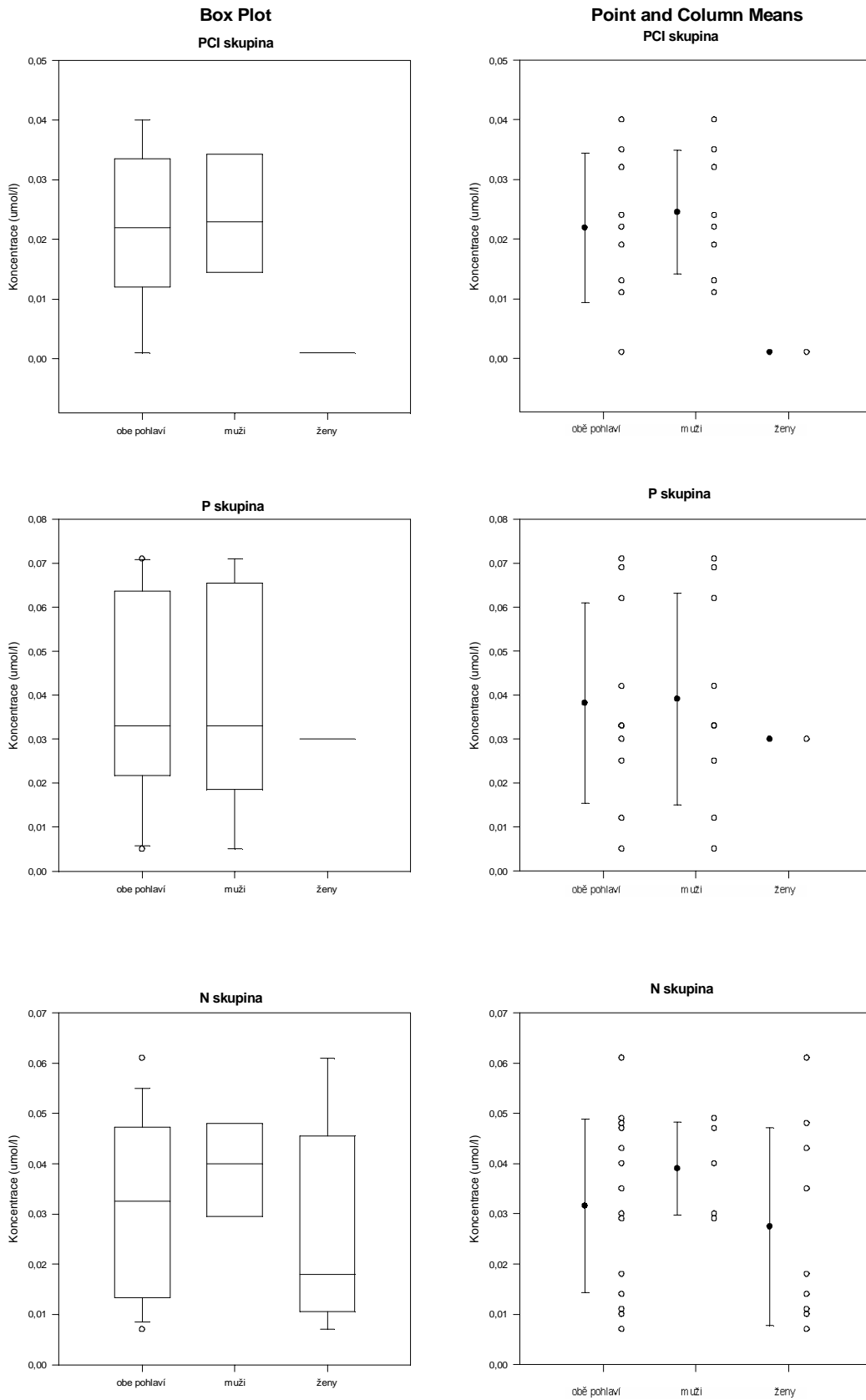
Příloha 3: Hladiny α -tokoferolu u mužů, žen a obou pohlaví ve skupině PCI, P a N, znázorněné krabicovými grafy a diagramy rozptýlení.



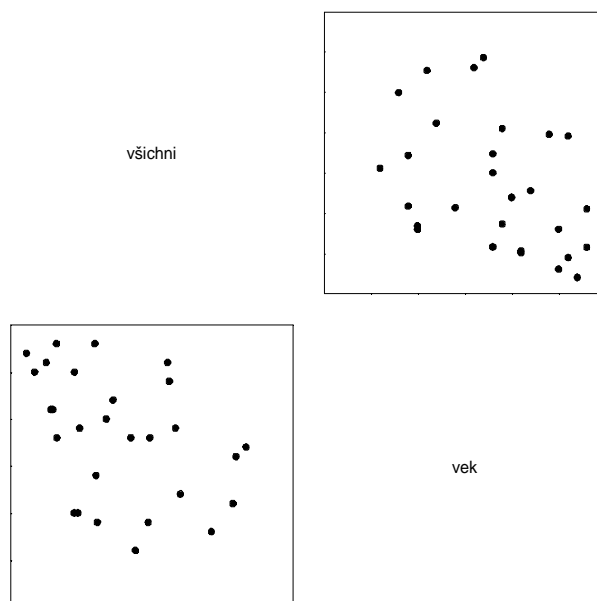
Příloha 4: Hladiny β -karotenu u mužů, žen a obou pohlaví ve skupině PCI, P a N, znázorněné krabicovými grafy a diagramy rozptýlení.



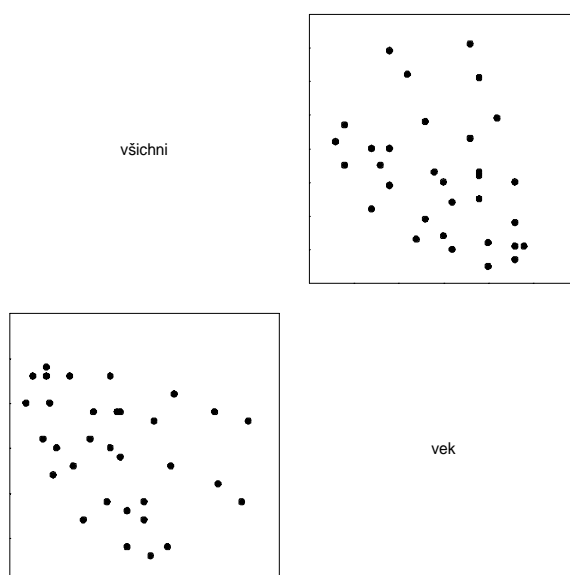
Příloha 5: Hladiny lykopenu u mužů, žen a obou pohlaví ve skupině PCI, P a N, znázorněné krabicovými grafy a diagramy rozptýlení.



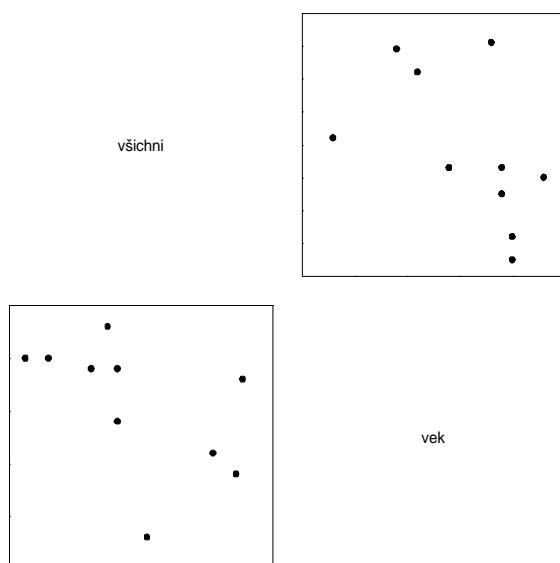
Scatter Matrix

**Příloha 6:** Korelační závislost hladin retinolu na věku ve skupině N obou pohlaví

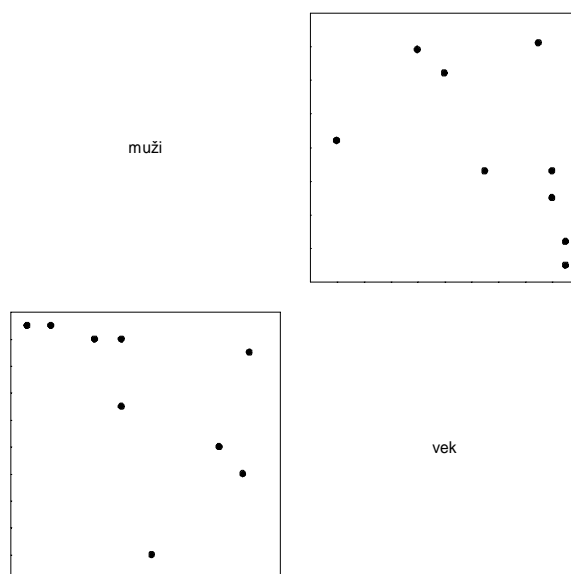
Scatter Matrix

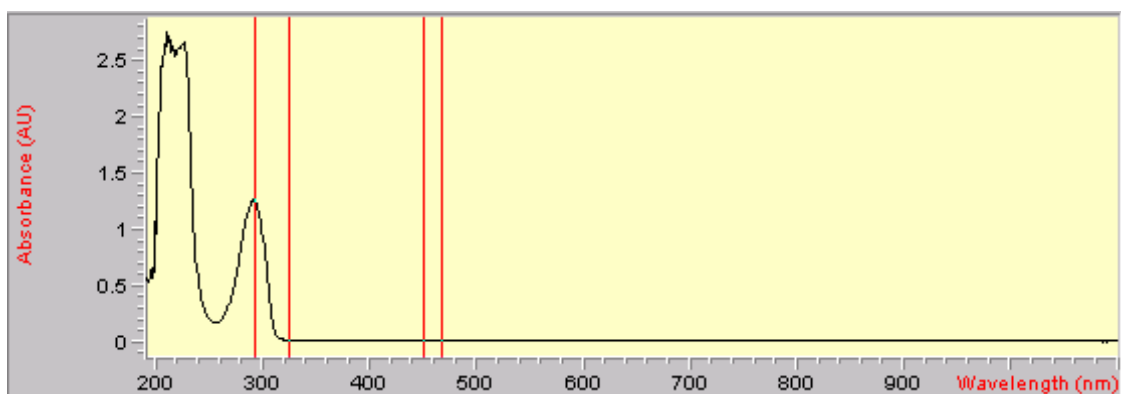
**Příloha 7:** Korelační závislost hladin lykopenu na věku ve skupině všech účastníků u obou pohlaví

Scatter Matrix

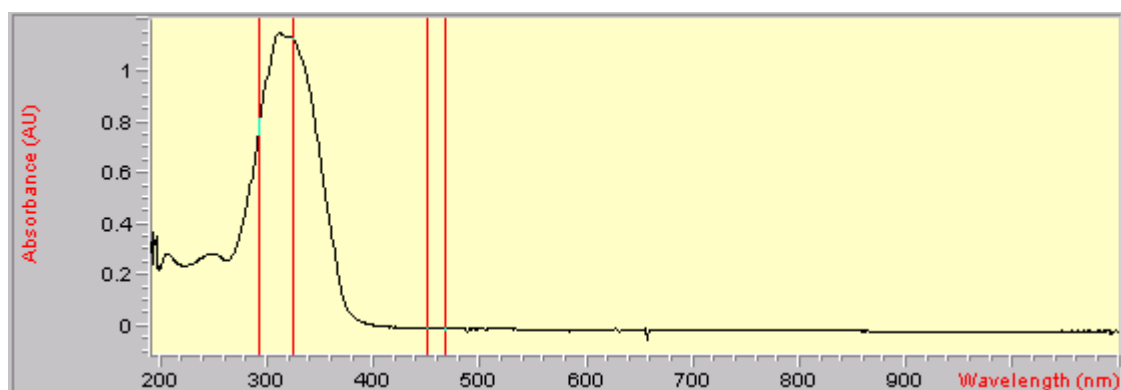
**Příloha 8:** Korelační závislost hladin lykopenu na věku ve skupině P u obou pohlaví

Scatter Matrix

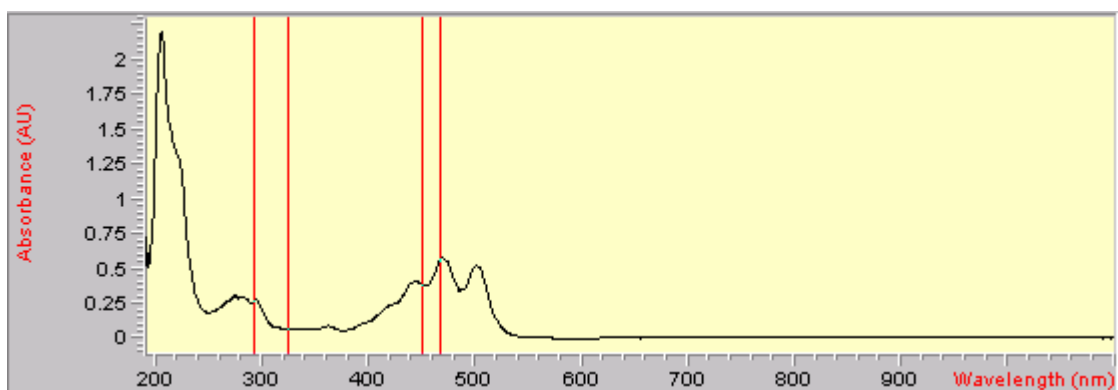
**Příloha 9:** Korelační závislost hladin lykopenu na věku ve skupině P u mužů



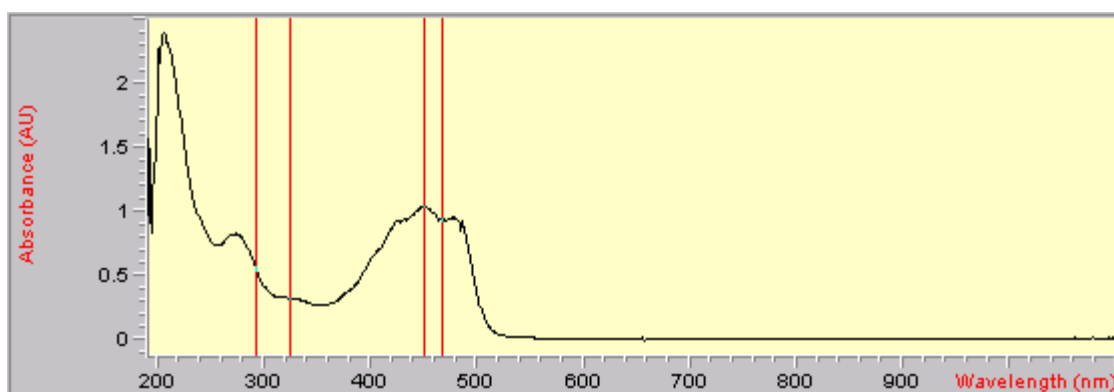
Příloha 10: Absorpční spektrum α -tokoferolu, absorpční maximum při 292 nm



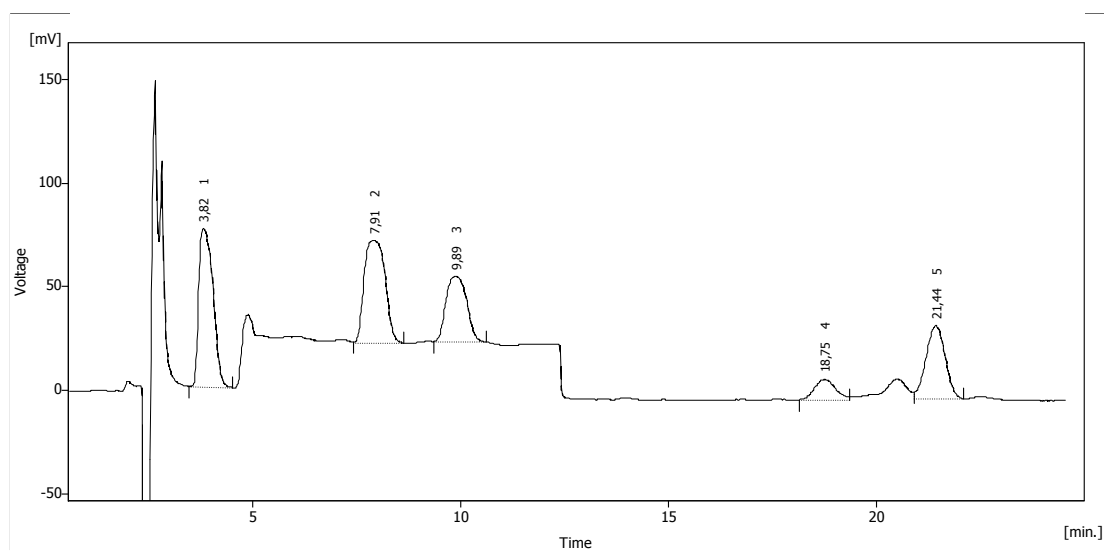
Příloha 11: Absorpční spektrum retinolu, absorpční maximum při 325 nm



Příloha 12: Absorpční spektrum lykopenu, absorpční maximum při 468 nm

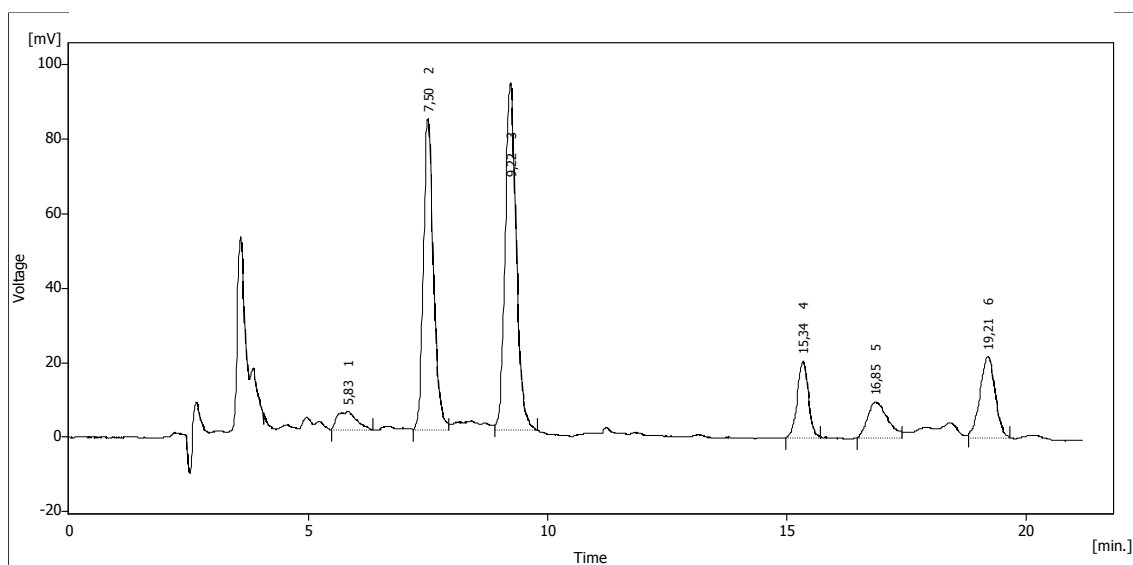


Příloha 13: Absorpční spektrum β -karotenu, absorpční maximum při 450 nm



Příloha 14: Chromatografický záznam vzorku plazmy. 1 - retinol (3,82 min), 2 - α -tokoferol (7,91 min), 3 - tokoferol acetát (9,89 min), 4 - lykopen (18,75 min), 5 - β -karoten (21,44 min).

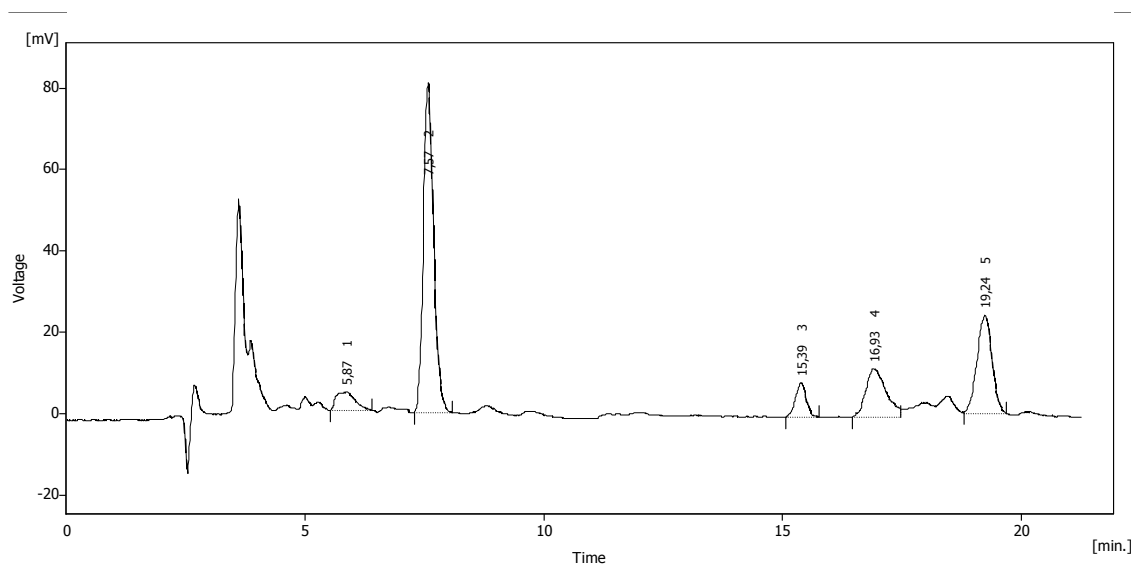
HPLC podmínky: průtok $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (0-11,35 min), $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (11,35-25 min); $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce (0-5 min – 325 nm, 5-7 min - 450 nm, 7-12 min – 292 nm, 12-25 min - 450 nm).



Příloha 15: Chromatografický záznam vzorku plazmy s přidáními vnitřními standardy.

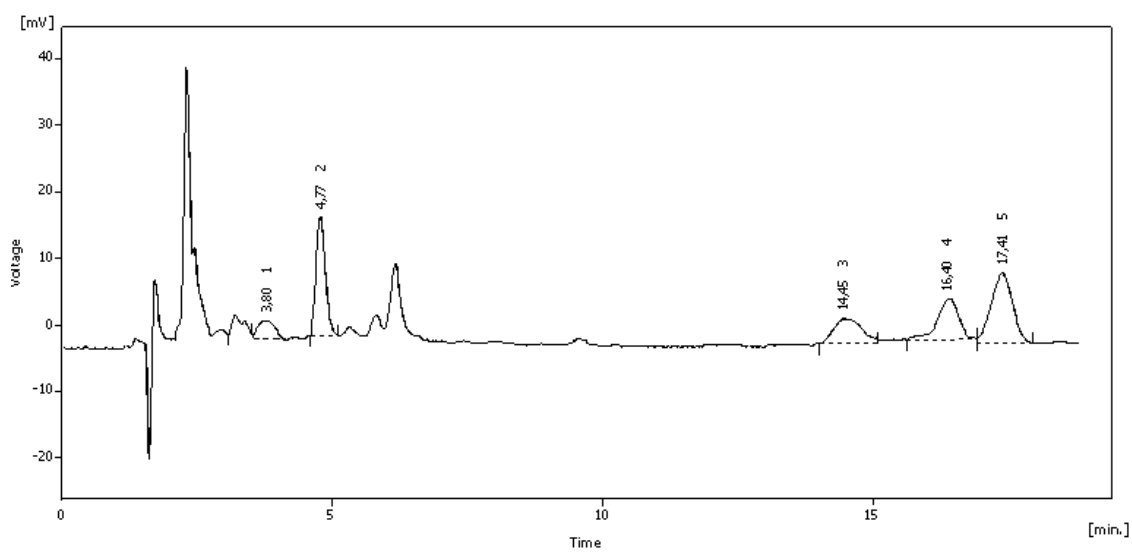
1 - lutein (5,83 min), 2 - α -tokoferol (7,50 min), 3 - tokoferol acetát (9,22 min),
4 - retinyl palmitát (15,34 min), 5 - lykopen (16,85 min), 6 – β -karoten (19,21 min).

HPLC podmínky: průtok $0,5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (0-11,05 min), $1,0\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (11,05-22 min);
T = 40 °C; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce (0-5 min – 325 nm,
5-7 min - 450 nm, 7-12 min – 292 nm, 12-22 min - 450 nm).

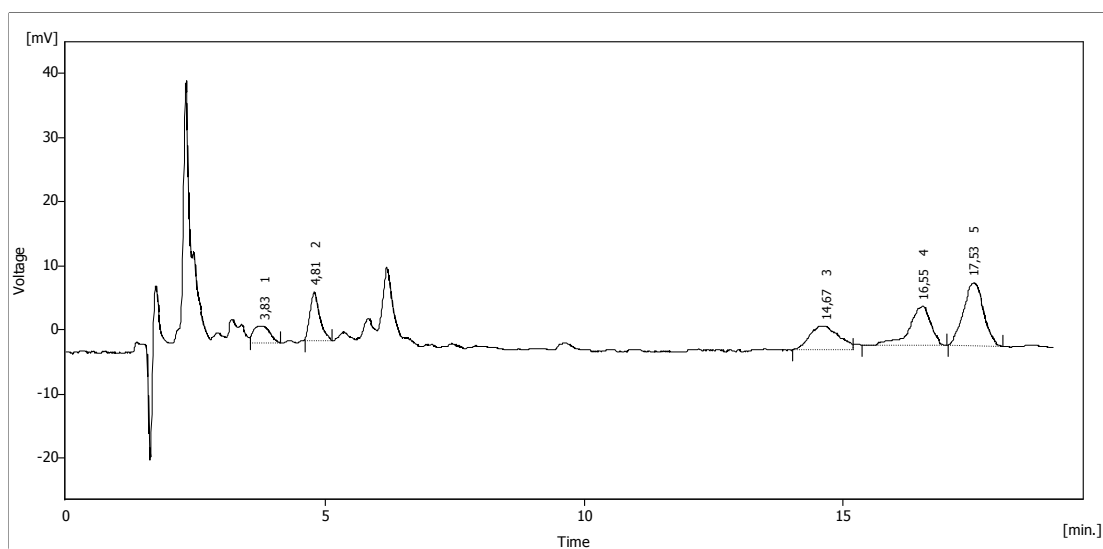


Příloha 16: Chromatografický záznam vzorku plazmy bez přidaných vnitřních standardů. 1 - lutein (5,87 min), 2 - α -tokoferol (7,57 min), 3 - retinyl palmitát (15,39 min), 4 - lykopen (16,93 min), 5 – β -karoten (19,24 min).

HPLC podmínky: stejné jako v příloze 15.

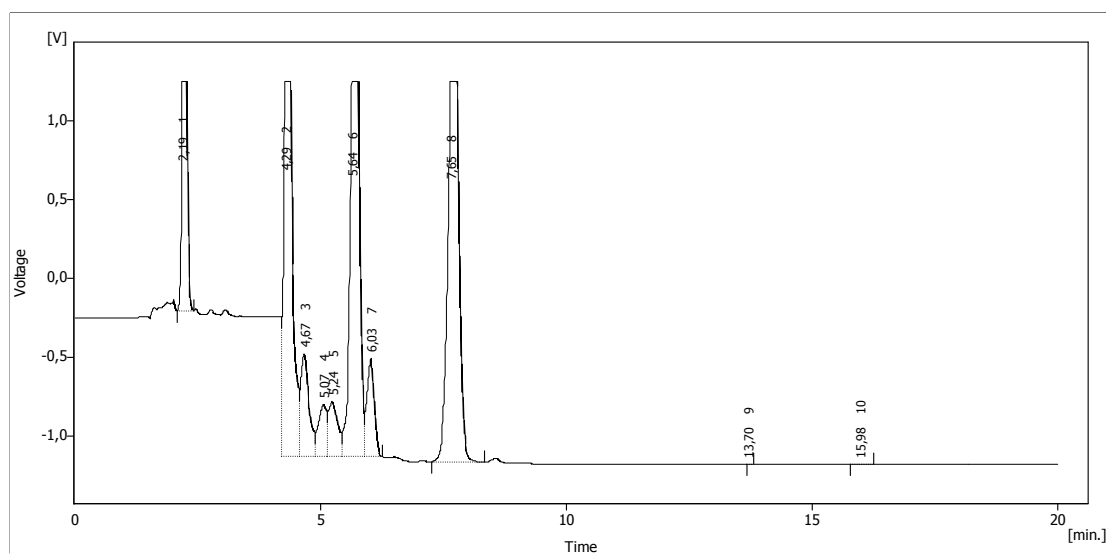


Příloha 17: Chromatografický záznam vzorku plazmy s přidáním vnitřním standardem β -apo-8'-karotenalu. 1 – lutein (3,80 min), 2 - β -apo-8'-karotenal (4,77 min), 3 - lykopen (14,45 min), 4 - α -karoten (16,40 min), 5 - β -karoten (17,41 min).
HPLC podmínky: průtok $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce 450 nm.



Příloha 18: Chromatografický záznam vzorku plazmy bez přidaného vnitřního standardu β -apo-8'-karotenalu. 1 – lutein (3,83 min), 2 - β -apo-8'-karotenal (4,81 min), 3 - lykopen (14,67 min), 4 - α -karoten (16,55 min), 5 - β -karoten (17,53 min).

HPLC podmínky: průtok $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce 450 nm.



Příloha 19: Chromatografický záznam vzorku plazmy s užitým 0,1% roztokem BTH v hexanu při extrakci.

HPLC podmínky: průtok $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; $T = 40 \text{ }^{\circ}\text{C}$; M.F.: methanol-ethanol (75:25, v/v); detekce (0-4 min – 325 nm, 4-10 min – 292 nm, 10-15,30 min - 468 nm, 15,30-20 min - 450 nm).