

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2022

Bc. Radka Machová

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky

Diplomová práce

2022

Bc. Radka Machová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Radka Machová**
Osobní číslo: **C18482**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky**
Téma práce anglicky: **Determination Of α -tocopherol In Human Blood Obtained By Dried Spot Technique**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Možnosti stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích, zaměření na metody HPLC s hmotnostní, fluorescenční a UV/Vis detekcí a metody GC s hmotnostní detekcí.
Zpracování vzorku suché kapky krve před vlastní analýzou.

Experimentální část:

Technika suché kapky krve, volba vhodných extrakčních činidel pro extrakci α -tokoferolu ze vzorku suché kapky krve.
Validace metody HPLC-MS pro stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Michal Kopčil**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Radka Machová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce, prof. Mgr. Romanovi Kand'árovi, Ph.D. za vstřícný přístup, odborné vedení mé práce a za poskytnuté rady a předané zkušenosti a Mgr. Michalu Kopčilovi za jeho rady a informace předané během mnoha hodin strávených v laboratoři i při sepisování práce a v neposlední řadě také za trpělivost při dosahování výsledků. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu a pochopení v průběhu psaní celé mé práce a po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá validací metody kapalinové chromatografie s hmotností detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve a optimalizací přípravy vzorku suché kapky krve. Teoretická část je věnována funkci vitamínu E a jeho isofomy α -tokoferolu v organismu. Dále je zde popsána technika suché kapky krve, její výhody, nevýhody a použití. Nakonec jsou popsány možnosti stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích s důrazem na kapalinovou chromatografii a hmotnostní spektrometrii. V experimentální části je popsán způsob přípravy vzorku a podmínky stanovení α -tokoferolu. Dále je zde popsáno použití vyvinuté metody pro analýzu vzorků suché kapky krve od dobrovolných dárců.

KLÍČOVÁ SLOVA

α -tokoferol, suchá kapka krve, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie

TITLE

Determination of α -tocopherol in human blood obtained by dried spot technique

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the validation of a liquid chromatography method with mass detection for the determination of α -tocopherol in a dried blood spot sample and the optimization of the preparation of a dried blood spot sample. The theoretical part is devoted to the functions of vitamin E and its α -tocopherol isoform in the body. Furthermore, the technique of dried blood spot, its advantages, disadvantages and uses are described here. Finally, the possibilities of α -tocopherol determination from biological samples are described with emphasis on liquid chromatography and mass spectrometry. The experimental part describes the method of sample preparation and conditions for the determination of α -tocopherol. Furthermore, the use of the developed method for the analysis of samples of dried blood spot from voluntary donors is described here.

KEYWORDS

α -tocopherol, dried blood spot, liquid chromatography, mass spectrometry

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	13
SEZNAM OBRÁZKŮ, ROVNIC, TABULEK A GRAFŮ	16
ÚVOD	18
1 TEORETICKÁ ČÁST	19
1.1 Vitamin E a α -tokoferol	19
1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti α -tokoferolu	19
1.1.2 Příjem a nedostatek vitamínu E s jeho projevy a důsledky	20
1.1.3 Metabolismus α -tokoferolu	21
1.1.4 Biologické funkce	24
1.1.4.1 Protizánětlivá a protinádorová aktivita, regulace homeostázy lipidů a lipoproteinů	24
1.1.4.2 Další úlohy α -tokoferolu v regulaci imunitního systému, přenosu signálu a genové exprese.....	25
1.1.4.3 Antioxidační ochrana	26
1.1.5 Úloha tokoferolů při léčbě některých onemocnění	27
1.2 Technika suché kapky krve	28
1.2.1 Odběr, transport a uchování vzorku suché kapky krve	28
1.2.1.1 Odběrové karty pro techniku suché kapky krve.....	29
1.2.1.2 Extrakce a analýza analytů ve vzorcích získaných technikou suché kapky.....	30
1.2.1.3 Automatizace při technice suché kapky krve.....	31
1.2.2 Historie techniky suché kapky krve	31

1.2.3	Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve.....	32
1.2.4	Klinické využití techniky suché kapky krve	33
1.2.4.1	Novorozenecký screening	33
1.2.4.2	Sérodiagnostika	34
1.2.4.3	Další aplikace	34
1.3	Stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích	35
1.3.1	Úprava vzorku před vlastní analýzou.....	35
1.3.1.1	Precipitace bílkovin.....	35
1.3.1.2	Saponifikace	35
1.3.1.3	Antioxidanty.....	36
1.3.1.4	Vnitřní standard.....	36
1.3.1.5	Extrakce kapalina-kapalina	36
1.3.1.6	Extrakce na pevné fázi	37
1.3.2	Konkrétní aplikace úpravy vzorků pro jednotlivé biologické matrice.....	38
1.3.2.1	Plazma a sérum	38
1.3.2.2	Erytrocyty a další krevní buňky	38
1.3.2.3	Další biologické vzorky	39
1.3.3	Metody stanovení α -tokoferolu.....	39
1.3.3.1	Separace tokoferolů a tokotrienolů metodou HPLC	40
1.3.3.2	Detektory používané při metodách vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení tokoferolů.....	41
1.3.3.3	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí	42

1.3.4	Další techniky a metody pro stanovení tokoferolů v biologických vzorcích.....	44
1.3.4.1	Plynová chromatografie	45
	CÍL PRÁCE.....	46
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
2.1	Chemikálie	47
2.2	Přístroje a pomůcky.....	47
2.3	Příprava zásobních a pracovních roztoků	49
2.4	Vzorky suché kapky krve.....	51
2.4.1	Odběr plné krve a příprava vzorků pro validaci.....	51
2.4.2	Odběr vzorků krve na odběrovou kartu	51
2.5	Příprava kalibrační řady standardů α -tokoferolu.....	51
2.6	Příprava a zpracování vzorků pro optimalizaci metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve	52
2.6.1	Extrakce činidlem obsahujícím α -tokoferol-D ₆ jako vnitřní standard	52
2.6.1.1	Volba extrakčního činidla	52
2.6.1.2	Doba a počet extrakcí.....	53
2.6.1.3	Způsob extrakce	53
2.6.2	Extrakce s činidlem obsahujícím α -tokoferolacetát jako vnitřní standard.....	53
2.6.3	Účinky matrice	53
2.6.4	Výtěžnost metody.....	54
2.6.5	Přesnost v sérii a mezi sériemi	54
2.6.6	Účinky hematokritu.....	54

2.6.7	Kalibrace	55
2.6.7.1	Kalibrace s α -tokoferolem-D ₆ jako vnitřním standardem	55
2.6.7.2	Kalibrace s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem	55
2.7	Příprava a zpracování vzorků suché kapky krve od dobrovolných dárců.....	56
2.8	Analytické parametry metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve.....	56
2.9	Chromatografické podmínky	57
2.10	Zpracování výsledků	59
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	60
3.1	Optimalizace podmínek kapalinové chromatografie a hmotnostní detekce.....	61
3.1.1	Kapalinová chromatografie	61
3.1.2	Hmotnostní spektrometrie	61
3.2	Volba extrakčního činidla s α -tokoferolem-D ₆ jako vnitřním standardem	62
3.3	Test počtu extrakcí a účinnost třepání nebo sonikace po různou dobu při extrakci α -tokoferolu ze vzorku suché kapky krve s α -tokoferolem-D ₆ jako vnitřním standardem	63
3.4	Test počtu extrakcí α -tokoferolu ze vzorku suché kapky krve s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem.....	65
3.5	Účinky matrice	66
3.6	Výtěžnost metody.....	66
3.7	Přesnost metody v sérii a mezi sériemi	67
3.8	Účinky hematokritu.....	68
3.9	Linearita metody	69

3.9.1	Kalibrační křivka s α -tokoferolem- D_6 jako vnitřním standardem	69
3.9.2	Kalibrační křivka s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem.....	73
3.10	Stanovení hladin α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců ..	75
ZÁVĚR		76
SEZNAM ZDROJŮ		77
PŘÍLOHY		102

SEZNAM ZKRATEK

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (z angl. atmospheric pressure chemical ionization)
CD36	transmembránový glykoprotein (z angl. cluster of differentiation)
CEC	kapilární elektrochromatografie (z angl. capillary electrochromatography)
CF	cystická fibróza
COX	cyklooxygenáza
CYP	cytochrom P450
DAD	detektor diodového pole (z angl. diode array detector)
DBMS	suchá kapka mateřského mléka (z angl. dried breast milk spot)
DBS	suchá kapka krve (z angl. dried blood spot)
DPS	suchá kapka plazmy (z angl. dried plasma spot)
DUS	suchá kapka moče (z angl. dried urine spot)
ED	elektrochemický detektor (z angl. electrochemical detector)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EI	elektronová ionizace (z angl. electron ionisation)
ELISA	imunochemická metoda používající enzym ke značení (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ERY	erytrocyty
ESI	elektrosprejová ionizace (z angl. electrospray ionization)
FLD	fluorescenční detektor (z angl. fluorescence detector)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GC-FID	spojení plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (z angl. gas chromatography-flame ionization detector)
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. gas chromatography-mass spectrometry)
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (z angl. high-density lipoproteins)

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (z angl. human immunodeficiency virus)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
Htc	hematokrit
ICM	metabolity se středně dlouhým řetězcem (z angl. intermediate-chain metabolites)
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
LC-MS	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. liquid chromatography-mass spectrometry)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. liquid chromatography with tandem mass spectrometry)
LCM	metabolity s dlouhým řetězcem (z angl. long-chain metabolites)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low-density lipoproteins)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (z angl. liquid-liquid extraction)
LPL	lipoproteinová lipáza
miRNA	mikro-ribonukleová kyselina (z angl. micro ribonucleic acid)
MRM	mód multiplexní analýzy (z angl. multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
NK	přírození zabíječi (z angl. natural killer)
NP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi (z angl. normal phase high-performance liquid chromatography)
NS	novorozenecký screening
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerázové řetězové reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PFSPE	extrakce tuhou fází s použitím nanovláken (z angl. packed fibre solid-phase extraction)

PKC	proteinkináza C
PKU	fenylketonurie (z angl. phenylketonuria)
Q	kvadrupól (z angl. quadrupole)
QqQ	trojitý kvadrupól
QTOF	spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (z angl. quadupole time-of-flight)
QTRAP	spojení kvadrupólu s analyzátozem lineární iontové pasti
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. reversed phase high-performance liquid chromatography)
SCM	metabolity s krátkým řetězcem (z angl. short-chain metabolites)
SFE	extrakce superkritickou tekutinou (z angl. supercritical fluid extraction)
SIM	mód monitorování vybraného iontu (z angl. selective ion monitoring)
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. solid phase extraction)
SRM	mód monitorování vybrané reakce (z angl. selected reaction monitoring)
TDM	monitorování hladin léků (z angl. therapeutic drug monitoring)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. thin layer chromatography)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. ultra high-performance liquid chromatography)
UV	ultrafialová oblast (z angl. ultraviolet)
Vis	viditelná oblast (z angl. visible)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (z angl. very low-density lipoproteins)
α -T	α -tokoferol
α -TTP	transportní protein pro α -tokoferol

SEZNAM OBRÁZKŮ, ROVNIC, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1: Struktura tokoferolů, tokotrienolů a rozdíly ve struktuře jejich isoform.....	19
Obrázek 2: Strukturní vzorec α -tokoferolu.....	20
Obrázek 3: Zjednodušené schéma transportu a metabolismu vitamínu E	23
Obrázek 4: Schéma reakce hydroxylové skupiny α -tokoferolu s peroxylovým radikálem	26
Obrázek 5: Odběrová karta Whatman 903®	30
Obrázek 6: Schéma ionizace elektrosprejem	43
Obrázek 7: Schéma trojitého kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru	44
Rovnice 1: Výpočet koncentrace α -tokoferolu při jednotkové absorbanci.....	49
Rovnice 2: Výpočet skutečné koncentrace zásobního roztoku α -tokoferolu.....	49
Rovnice 3: Výpočet směrodatné odchylky	57
Rovnice 4: Výpočet variačního koeficientu.....	57
Rovnice 5: Výpočet meze detekce (LOD) z kalibračních křivek	73
Rovnice 6: Výpočet meze stanovitelnosti (LOQ) z kalibračních křivek	73
Tabulka 1: Příprava jednotlivých kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky	52
Tabulka 2: Příprava vzorků suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu	55
Tabulka 3: Optimalizované podmínky pro hmotnostní spektrometr	59
Tabulka 4: Volba vhodného extrakčního činidla	62
Tabulka 5: Výsledky testu počtu extrakcí a účinnost třepání a sonikace při extrakci	63
Tabulka 6: Výsledky testu počtu extrakcí.....	65
Tabulka 7: Výtěžnost metody pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapce krve	67
Tabulka 8: Přesnost metody pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve	67
Tabulka 9: Vliv hematokritu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve	68
Tabulka 10: Plochy α -tokoferolu a α -tokoferolu-D ₆ kalibračních standardů připravených v krvi	69

Tabulka 11: Plochy α -tokoferolu a α -tokoferolu-D ₆ kalibračních standardů připravených v ethanolu	70
Tabulka 12: Parametry kalibračních křivek pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve	74
Tabulka 13: Hladiny α -tokoferolu v krvi určené ze vzorků získaných technikou suché kapky krve od dobrovolných dárců.....	75
Graf 1: Závislost průměrné \pm SD velikosti plochy píků α -tokoferolu na extrakčním činidle.....	62
Graf 2: Závislost průměru \pm SD poměru plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolu-D ₆ na počtu extrakcí a účinnosti třepání nebo sonikace	64
Graf 3: Výťažnost extrakce v závislosti na času a způsobu extrakce	64
Graf 4: Závislost poměru plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolacetátu na počtu extrakcí	65
Graf 5: Výťažnost extrakce v závislosti na počtu extrakcí	66
Graf 6: Vliv hematokritu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve....	68
Graf 7: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve se standardy připravenými v krvi.....	70
Graf 8: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve se standardy připravenými v ethanolu	71
Graf 9: Závislost nárůstu plochy IS α -tokoferolu-D ₆ na koncentraci α -tokoferolu v ethanolu	72
Graf 10: Závislost nárůstu plochy IS α -tokoferolacetátu na koncentraci α -tokoferolu v ethanolu.....	72
Graf 11: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve	73

ÚVOD

V současnosti se globálně potýkáme s nárůstem nejrůznějších civilizačních chorob. Mnoho z nich je z velké části způsobeno především nevhodným životním stylem, stresem a špatnou výživou. Právě úpravou stravy lze dosáhnout zlepšení celkového zdravotního stavu. Vitamin E, nejvíce jeho isoforma α -tokoferol, je důležitou mikroživinou rozpustnou v tucích. Nejčastěji ho přijímáme v rostlinných olejích a jeho nedostatek způsobuje neurologické potíže, snížení obranyschopnosti, nebo poruchy funkce gonád. V organismu má vitamin E řadu důležitých funkcí, nejvýznamnější z nich je jeho antioxidační aktivita, kdy chrání buněčné membrány před poškozením volnými radikály a tím pomáhá zpomalovat stárnutí a má protinádorové a protiinfekční účinky. Působí také preventivně proti rozvoji diabetu či aterosklerózy a má pozitivní účinky na tvorbu gamet, zvyšuje plodnost a podporuje činnost nervového systému. Bylo zjištěno, že jeho metabolismus je úzce spojen s metabolismem lipoproteinů a cholesterolu a navzájem se také ovlivňují.

Technika suché kapky krve (DBS) je forma odběru biologických vzorků, při které je krev nasáta na speciální filtrační papír a vysušena. Vysušené vzorky lze snadno odeslat do laboratoře a analyzovat různými metodami. V posledních letech nabývá použití techniky DBS na významu, protože tato metoda vykazuje velké výhody ve srovnání s konvenčním odběrem krve. Jsou jimi například potřeba nízkých objemů krve, snadná přeprava, skladování a ukládání do biobank, minimální invazivita a snadná automatizace. V klinické praxi je technika DBS využívána v novorozeneckém screeningu, sérodiagnostice, metabolomice, terapeutickém monitorování léků a v mnoha dalších odvětvích. Aktuálně je také studováno použití této techniky v rámci pandemie koronaviru pro detekci protilátek proti SARS-CoV-2.

Analýza α -tokoferolu byla v minulosti prováděna zejména HPLC s detekcí UV, FLD nebo MS. Zvláštní důraz je kladen na extrakci α -tokoferolu z biologické matrice a na úpravu vzorku před vlastní analýzou. Značné usnadnění všech těchto kroků představuje oproti odběru plné krve právě technika DBS. I přes její velký potenciál využití v analýze α -tokoferolu, bylo zatím provedeno málo studií s využitím této techniky. V literatuře je popsána pouze jediná metoda založená na spojení DBS a LC-MS/MS pro stanovení tokoferolů.

Tato práce je zaměřena na validaci metody stanovení α -tokoferolu kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí ze vzorku suché kapky krve a na optimalizaci přípravy vzorku DBS.

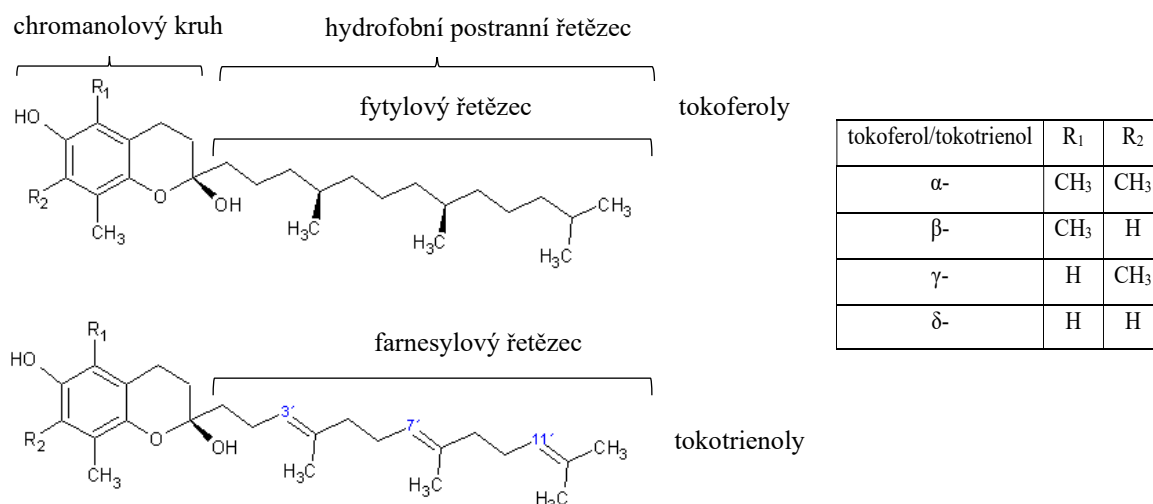
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vitamin E a α -tokoferol

Vitamin E patří mezi vitaminy přírodního původu rozpustné v tucích a v organismu má významné biologické účinky. Pouze fotosyntetické organismy, rostliny, řasy a sinice, stejně jako houby, korály, houby a pláštěnci, mají schopnost syntetizovat tyto sloučeniny [1, 2].

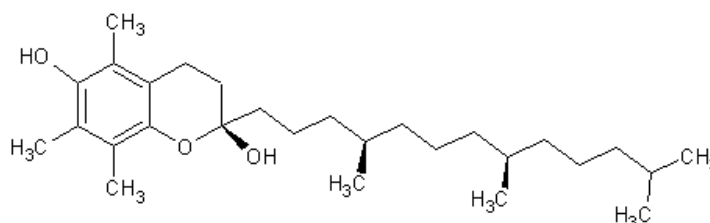
1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti α -tokoferolu

Chemicky je vitamin E skupina 8 isomerů zahrnující 4 tokoferoly (α -, β -, γ - a δ -) a 4 tokotrienoly (α -, β -, γ - a δ -), které se liší nasycením svého postranního řetězce a stupněm methylace chromanolového kruhu (hydrofilní 6-chromanol) v poloze 5' a 7'. Zatímco tokoferoly mají nasycený postranní řetězec (alifatický fytylový postranní řetězec), tokotrienoly mají nenasycený isoprenoidní postranní řetězec obsahující tři dvojné vazby (nenasycený farnesylový postranní řetězec) (obrázek 1). Přirozeně se vyskytující tokoferoly obsahují tři chirální centra s konfigurací R v poloze 2', 4' a 8', jsou tedy RRR. Na chromanolovém kruhu je připojena jedna hydroxylová skupina, která je donorem vodíkových atomů a podmiňuje antioxidační účinek. Vedlejší hydrofobní řetězec je příčinou dobré rozpustnosti v tucích a zajišťuje snadný průnik do buněčných membrán. Biologicky neaktivnější formou v těle savců je α -tokoferol (α -T), což je dominantní forma vitaminu E nacházející se v krvi a tkáních [2-11].



Obrázek 1: Struktura tokoferolů, tokotrienolů a rozdíly ve struktuře jejich isoform, převzato a upraveno z [12]

Sumární vzorec α -tokoferolu je $C_{29}H_{50}O_2$, přesný název dle IUPAC (z angl. International Union of Pure and Applied Chemistry) potom (2*S*)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4*S*,8*S*)-4,8,12-trimethyltridecyl]-3,4-dihydrochromen-6-ol. Molekulová hmotnost je 430,7 g/mol. Strukturní vzorec je uveden na obrázku 2.



Obrázek 2: Strukturní vzorec α -tokoferolu

1.1.2 Příjem a nedostatek vitamínu E s jeho projevy a důsledky

Vitamin E, respektive α -tokoferol, je v potravě přijímán nejčastěji v rostlinných olejích. Hlavními zdroji tokoferolů jsou mandlový a další oleje, jako například ořechový, olivový, slunečnicový, řepkový, kukuřičný, lněný a sójový. Tokotrienoly lze nalézt v oleji z palmových a rýžových otrub, pšeničných klíčcích, ječmeni, ovsu, lískových oříscích a kukuřici. Dalšími zdroji v potravě jsou salát, máslo, maso savců a mléko. Vyskytuje se také v mateřském mléce, kde převládajícím stereoisomerem je přirozeně se vyskytující RRR- α -tokoferol. Dále se používá v doplňcích stravy, konkrétně *all-rac- α -tokoferol*, syntetická racemická směs 8 stereoisomerů [13]. Vitamin E se ničí během kuchyňské úpravy, jako je například smažení [14].

Ačkoli α -tokoferol a γ -tokoferol jsou nejhojnějšími formami vitamínu E ve stravě, dietní požadavky na vitamin E jsou v současné době omezeny pouze na α -tokoferol, protože je to jediná forma, která dokáže zvrátit nedostatek vitamínu E a žádná jiná forma vitamínu E se v lidském organismu nedokáže převést na α -tokoferol [8].

Nedostatek vitamínu E zapříčiňuje neurologické potíže, snížení obranyschopnosti nebo poruchy funkce gonád. U novorozenců pak jeho nedostatek může vyvolat anémii. Symptomy se obvykle rozvíjejí u předčasně narozených dětí, kojenců a dospělých s malabsorpcí tuku, onemocněním jater nebo genetickými chorobami [15]. Díky lipofilní povaze α -tokoferolu mohou poruchy vstřebávání lipidů ze střeva (chronická steatorea, cystická fibróza nebo při resekci střeva) vést k příznakům jeho nedostatku [5, 16]. Extrémně nízké

hodnoty α -tokoferolu v těle mohou vést k onemocnění zvanému ataxie s nedostatkem vitamínu E. Jedná se o vzácnou poruchu způsobenou mutací v genu kódujícím transportní protein pro α -tokoferol (α -TTP). Pacienti s tímto onemocněním mají schopnost absorbovat isoformy vitamínu E ve střevě, ale mají extrémně špatnou schopnost jej zadržet. Kromě ataxie, způsobuje těžký nedostatek α -tokoferolu kardiovaskulární onemocnění, rakovinu a šedý zákal [17-19].

Potřeba α -tokoferolu se zvyšuje při zvýšeném příjmu nenasycených tuků nebo při zvýšené expozici kyslíku. V porovnání s jinými vitamíny rozpustnými v tucích je vitamin E relativně málo toxický. Dlouhodobé užívání vysokých dávek zhoršuje vstřebávání vitamínu K [4, 5, 16].

Průměrný příjem α -tokoferolu u lidí je 12 mg/den, ale jeho příjem v potravě a hladiny v plazmě vykazují značné rozdíly mezi jedinci. Podle pravidel Evropského úřadu pro bezpečnost potravin vydaných v roce 2015, byl u dospělých navržen adekvátní příjem pro α -tokoferol 13 mg/den pro muže a 11 mg/den pro ženy [7, 20, 21].

1.1.3 Metabolismus α -tokoferolu

Absorpce tokoferolů a tokotrienolů ve střevě se pohybuje od 20 do 80 % z celkového přijatého množství a je nižší než u ostatních vitamínů rozpustných v tucích. Množství absorbovaného vitamínu E závisí na rozdílech v matrici potravy, která tento vitamin dodává. Například alkohol inhibuje vstřebávání vitamínu E. Studie také prokázaly nízkou biologickou dostupnost isoform vitamínu E z matrice jablek a vysokou biologickou dostupnost z matrice banánů, chleba a salátu [22].

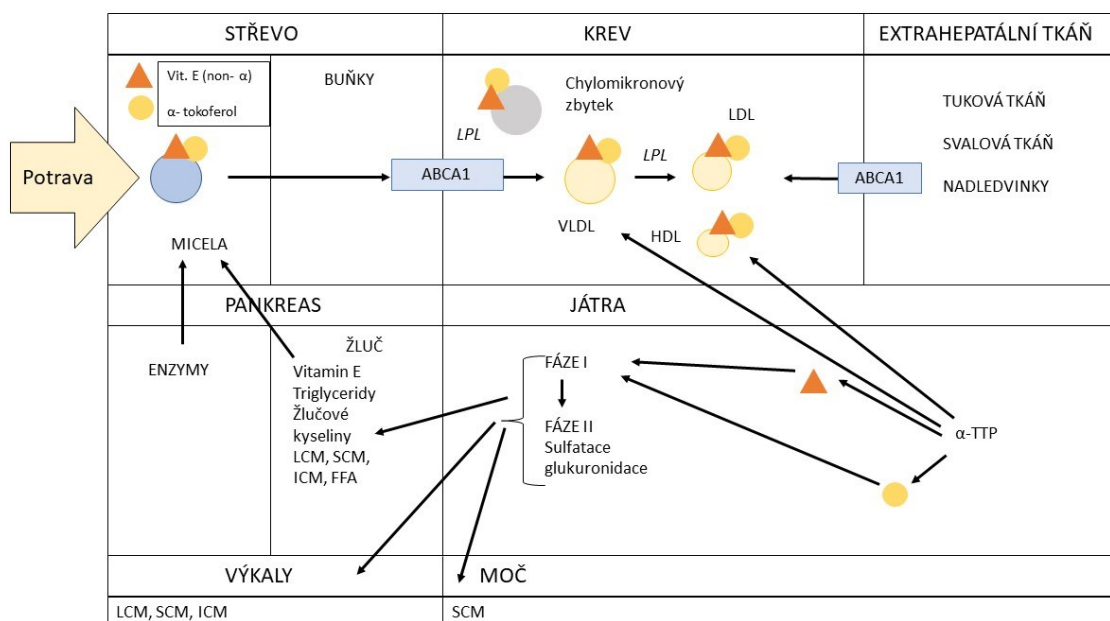
Výsledky mnoha studií prokázaly, že živočichové (včetně lidí) přednostně absorbují přirozený stereoisomer RRR- α -tokoferol díky afinitě α -TTP k formám s konfigurací R [10, 23]. Plazma a tělesné tkáně jsou z 90 % nasyceny α -tokoferolem, zatímco ostatní formy vitamínu E jsou degradovány a vylučovány [24-26].

Ukázalo se, že transmembránové proteiny hrají klíčovou úlohu v absorpci vitamínu E střevem. Původně se předpokládalo, že absorpce vitamínu E probíhá pasivní difúzí přes membránu enterocytů. V pozdějších letech se ukázalo, že absorpce je také zprostředkována, alespoň částečně, třemi skupinami proteinů: NPC1L1 (protein vázající se na mediátor absorpce cholesterolu; z angl. Niemann-Pick C1-like 1 protein), SRB1 (scavenger receptor třídy B,

typu 1; z angl. scavenger receptor class B type 1) a CD36 (z angl. cluster of differentiation). Tyto tři proteiny jsou popisovány hlavně jako transportéry cholesterolu, ale mohou vázat i jiné substráty [11, 27, 28].

Ve střevě je vitamin E spolu s dalšími lipidy zabalen do micel, které jsou vychytávány receptory. Ve střevních epiteliálních buňkách je vitamin E inkorporován do chylomikronů nebo HDL (z angl. high-density lipoproteins) prostřednictvím ABCA1 (ATP vázající transportní protein pro cholesterol, z angl. ATP-binding cassette subfamily A member). Vitamin E je v krvi transportován lipoproteiny a erytrocyty. Po vstupu do krevního oběhu procházejí chylomikrony rekonstrukčním procesem spočívajícím především v hydrolyze triacylglycerolů lipoproteinovou lipázou (LPL), jejímž výsledkem je tvorba chylomikronových zbytků. Část forem vitaminu E je vychytávána extrahepatální tkání a zbývající část vitaminu E inkorporovaného ve zbytcích chylomikronů je vychytávána játry [12, 29].

Ze všech isoform, je pouze α -tokoferol vázán α -TTP, který jej přenáší k lipoproteinům a do dalších částí těla. α -TTP zprostředkovává začlenění α -tokoferolu do VLDL (z angl. very-low-density lipoproteins) a sekreci těchto komplexů do krevního oběhu. V krvi jsou VLDL katabolizovány na LDL (z angl. low-density lipoproteins) a HDL LPL. Katabolismus VLDL způsobuje, že se α -tokoferol vyskytuje současně ve všech výše uvedených typech lipoproteinů. α -Tokoferol, který je dodáván do LDL, je přenášen do tkání, kde plní své funkce (obrázek 3) [30-32].



Obrázek 3: Zjednodušené schéma transportu a metabolismu vitamínu E

(LPL, lipoproteinová lipáza; LDL, lipoproteiny o nízké hustotě; VLDL, lipoproteiny o velmi nízké hustotě; HDL, lipoproteiny o vysoké hustotě; ABCA1, ATP vázající transportní protein pro cholesterol; α -TTP, transportní protein pro α -tokoferol; LCM, metabolity s dlouhým řetězcem; SCM, metabolity s krátkým řetězcem; ICM, metabolity se středně dlouhým řetězcem; FFA, mastné kyseliny), převzato a upraveno z [12]

Zpočátku se předpokládalo, že metabolismus α -tokoferolu probíhá otevřením chromanolového kruhu a následnou degradací postranního řetězce, kdy vznikají pouze dva metabolity, kyselina α -tokoferonová a její lakton, α -tokoferonolakton, tzv. Simonovy metabolity [33, 34]. V pozdějších letech byly definovány další metabolické dráhy po objevu dalších metabolitů α -tokoferolu s neporušeným chromanolovým kruhem. Metabolismus isoformů vitamínu E zahrnuje ω -hydroxylaci (fáze I) na alkoholový derivát 13'-OH, katalyzovanou CYP4F2 (cytochrom P450), která probíhá v endoplazmatickém retikulu jaterních buněk. Tyto produkty jsou považovány za metabolický meziprodukt fáze I a omezují akumulaci lipofilního vitamínu [35, 36]. Oxidovaná hydroxylová skupina vede k tvorbě 13'-COOH metabolitů s dlouhým řetězcem (LCM, z angl. long-chain metabolites) působením aldehyddehydrogenázy. Následuje série β -oxidací v peroxisomech za vzniku karboxychromanolů se středním řetězcem, 11'-COOH, 9'-COOH (ICM, z angl. intermediate-chain metabolites) a oxidací v matrix mitochondrií vznikají karboxychromanoly s krátkým řetězcem 7'-COOH, 5'-COOH (SCM, z angl. short-chain metabolites). Konečnými produkty metabolismu vitamínu E jsou karboxyethylhydroxychromanoly (CEHC), označované jako

3'-COOH SCM. Metabolity jsou vylučovány z těla močí a stolicí [37]. V lidské moči se metabolity nacházejí ve volné formě nebo jako sulfáty či glukuronidy [38, 39].

Tokoferoly i tokotrienoly se akumulují v mnoha tkáních, mimo jiné v játrech, nadledvinách a tukové tkáni [12, 40]. Odhaduje se, že 90 % celkového množství vitamínu E je akumulováno v tukové tkáni, především v kapkách lipidů adipocytů [41]. Vitamin E akumulovaný v tukové tkáni se skládá ze dvou třetin z α -tokoferolu a z jedné třetiny z γ -tokoferolu [42].

1.1.4 Biologické funkce

Kromě nejpodstatnější antioxidační aktivity všech isoform vitamínu E, existují další důležité funkce metabolitů vitamínu E. Ty lze rozdělit z hlediska protizánětlivé a protinádorové aktivity, účasti na regulaci homeostázy lipidů a lipoproteinů, lékových interakcí a regulace vlastního metabolismu metabolitů [38, 43]. Příznivý dopad na lidské zdraví může také vyplývat ze schopnosti modulace signalizačních procesů buňky a genové exprese u zánětů a poruch imunitního systému, Několika způsoby také posiluje buňkami zprostředkovanou imunitu [44-46].

α -Tokoferol se používá k prevenci a léčbě rakoviny a onemocnění centrálního nervového, imunitního a kardiovaskulárního systému. Existují určité důkazy, že zpomaluje progresi věkem podmíněné degenerace a je prospěšný při léčbě diabetu a nealkoholického onemocnění jater, působí preventivně při vzniku aterosklerózy [47].

1.1.4.1 Protizánětlivá a protinádorová aktivita, regulace homeostázy lipidů a lipoproteinů

Hlavním nástrojem v rámci protizánětlivé aktivity je možnost regulace prozánětlivých enzymů metabolity vitamínu E díky specifickým interakcím s enzymy, strukturálními proteiny a lipidy a transkripčními faktory [48-51].

α -Tokoferol inhibuje aktivitu proteinkinázy C (PKC), fosfolipázy A2 a cyklooxygenázy (COX). Inhibice PKC má za následek různé děje v různých typech buněk. Ovlivňuje inhibici agregace krevních destiček, produkci radikálu oxidu dusnatého v endoteliálních buňkách, proliferaci monocytů, makrofágů a neutrofilů buněk hladkého svalstva a snižuje produkci volných superoxidových radikálů v neutrofilech a makrofázích [52]. Jednou z nejdůležitějších

funkcí fosfolipázy A2 je uvolňování kyseliny arachidonové z membránových fosfolipidů pro syntézu biologicky aktivních eikosanoidů [52, 53]. Dále byl prokázán inhibiční účinek metabolitů α -tokoferolu, α -9'-COOH a α -13'-COOH, na aktivitu COX, která katalyzuje prozánětlivou produkci eikosanoidů [48, 54].

α -Tokoferol ovlivňuje expresi adhezních molekul, produkci cytokinů a také scavenger receptory, zvláště důležité při tvorbě aterosklerotických pěnových buněk. Makrofágy vychytávají oxidovaný LDL (oxLDL) prostřednictvím mnoha typů receptorů, mezi nimi scavenger receptoru CD36, který se také podílí na transportu α -tokoferolu. Exprese CD36 je snižována α -tokoferolem, zatímco metabolity α -tokoferolu s dlouhým řetězcem (α -13'-OH a α -13'-COOH) ovlivňují vychytávání oxLDL nezávisle na CD36. α -tokoferol a jeho metabolity dokážou inhibovat tvorbu pěnových buněk makrofágů, čímž mají pozitivní vliv na prevenci aterosklerózy [52, 55, 56].

Dalším způsobem, kterým metabolit α -tokoferolu α -13'-COOH inhibuje zánět, je cílení na 5-lipoxygenázu, která katalyzuje počáteční fázi biosyntézy silných imunomodulačních lipidových mediátorů, leukotrienů. Ty hrají hlavní úlohu při rozvoji astmatu a alergické rýmy a přispívají také k oxidativnímu poškození DNA [57-59].

Studie zaměřené na protinádorové vlastnosti ukázaly, že metabolity α -tokoferolu a δ -tokoferolu zastavily proliferaci v buněčné linii rakoviny lidských hepatocytů HepG2 [43, 60].

1.1.4.2 Další úlohy α -tokoferolu v regulaci imunitního systému, přenosu signálu a genové exprese

Jak protizánětlivé, tak antioxidační funkce α -tokoferolu mohou posílit imunitní systém. Kromě toho α -tokoferol reguluje zrání a fungování dendritických buněk, zvyšuje aktivitu NK buněk (z angl. natural killer), a tím posiluje humorální odpověď. Tokoferoly mají také schopnost modulovat přenos signálu a genovou expresi [15, 61-63].

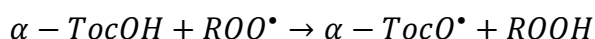
α -Tokoferol aktivuje například koagulační faktor IX podílející se na srážení krve a 5α -reduktázu steroidů katalyzující přeměnu testosteronu na 5α -dihydrotestosteron. α -Tokoferol také reguluje kaskádu přenosu signálu nejen na úrovni mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina), ale také na úrovni miRNA (mikro-ribonukleová kyselina), protože miRNA 122a (účastní se metabolismu lipidů) a miRNA 125b (účastní se mechanismu

zánětu) jsou inhibovány α -tokoferolem [64]. Bylo zjištěno, že metabolit α -13'-OH zvyšuje expresi genu pro CYP4F2 v lidských jaterních buňkách HepG2. Tento protein se podílí na metabolismu vitamínu E. To dokazuje, že deriváty metabolismu vitamínu E, především α -13'-OH, mohou být zodpovědné za existenci pozitivní regulační zpětnovazebné smyčky, která se v metabolismu vitamínu E vyskytuje [65].

1.1.4.3 Antioxidační ochrana

Všechny buněčné membrány obsahují tuky, které se snadno oxidují atakem volných radikálů. Tento proces se nazývá peroxidace lipidů. Tento proces je přerušen působením α -tokoferolu, který je tisíckrát náchylnější k reakci s peroxylovými radikály než nenasycené mastné kyseliny [11, 66]. Chrání tak buněčné membrány před poškozením volnými radikály, tím pomáhá zpomalovat stárnutí a má protinádorové účinky. Má také pozitivní účinky na tvorbu gamet, zvyšuje plodnost a podporuje činnost nervového systému [4].

Antioxidační vlastnosti vitamínu E se uplatňují prostřednictvím jeho fenolické hydroxylové skupiny, která předává vodík peroxylovým radikálům (obrázek 4) [7, 64]. Kromě toho může lipofilní konec α -tokoferolu interagovat s lipidy a jinými molekulami buňky a chránit je před oxidací nebo peroxidací. α -Tokoferoxylový radikál má relativně dlouhou životnost a může být redukován na α -tokoferol ve vodě rozpustnými antioxidanty, jako je kyselina askorbová [36, 67].



Obrázek 4: Schéma reakce hydroxylové skupiny α -tokoferolu s peroxylovým radikálem

1.1.5 Úloha tokoferolů při léčbě některých onemocnění

Tokoferoly se užívají jako antilipidemika [68], antidiabetika [69] a při léčbě obezity [70] a nealkoholické steatohepatitidy [71].

Navzdory prokázaným protizánětlivým účinkům bylo zjištěno, že protektivní účinek při suplementaci α -tokoferolu u zdravých jedinců nebyl dosažen. Stalo se tak pouze u těch, kteří trpěli nedostatkem α -tokoferolu. Příjem vysokých dávek α -tokoferolu je spojen se zvýšením celkové mortality a může zhoršit průběh infekce dýchacích cest u starších osob. Tyto nepříznivé účinky mohou být vysvětleny komplexní interakcí různých forem vitamínu E se signalizací zánětu, nebo biotransformací xenobiotik. Potenciální účinek α -tokoferolu na enzymy biotransformující xenobiotika mohou komplikovat nebo v některých případech dokonce působí proti funkci daného léčiva [9, 72-74].

1.2 Technika suché kapky krve

Technika suché kapky je forma odběru biologických vzorků, při které jsou biologické tekutiny nasáty na filtrační papír a vysušeny. Takto vysušené vzorky lze snadno odeslat do laboratoře a analyzovat různými metodami. Nejznámější je technika suché kapky krve (DBS, z angl. dried blood spot), známá již více než pět desetiletí. V posledních letech nabývá použití DBS na významu, protože tato metoda vykazuje velké výhody ve srovnání s konvenčním odběrem a analýzou vzorků krve nebo plazmy [75-77].

Nedávný vývoj ověřených metod pro analýzu celé řady analytů z krve získané technikou DBS v různých oblastech použití naznačuje vysoký potenciál. Tato technika je použitelná pro farmakokinetické a toxikokinetické studie, stejně jako pro mnoho dalších oborů, jako je zdravotnická a forenzní analýza [78].

Existují také podobné způsoby odběru vzorků s jinými tělesnými tekutinami, jako je technika suché kapky moče (DUS, z angl. dried urine spot) užívaná pro stanovení specifických metabolitů v moči odražejících předchozí příjem léčiva po dobu několika hodin až několika dnů, nebo technika suché kapky plazmy (DPS, z angl. dried plasma spot), kde je značnou výhodou to, že plazma různých pacientů se neliší ve viskozitě na rozdíl od vzorků plné krve, nebo technika suché kapky mateřského mléka (DBMS, z angl. dried breast milk spot) [75-77].

1.2.1 Odběr, transport a uchování vzorku suché kapky krve

Odběr vzorků DBS se provádí píchnutím lancetou do hloubky asi 2 mm do dobře očištěného místa na prstu, patě nebo noze. Vzniklá kapka krve se pak nanáší na filtrační papír nebo předtištěné terčíky, ideálně jedna kapka na terčík. Je třeba se vyvarovat dotyku v oblasti terčíku, zejména před aplikací krve a před jejím úplným zaschnutím. Vzorek krve lze také nanést kalibrovanou pipetou, čímž se zabrání případným chybám při odběru vzorků. Před uskladněním nebo přepravou je velmi důležité skvrny úplně vysušit. Obecně se doporučuje minimálně 2-3 hodiny sušení v otevřeném prostoru při pokojové teplotě. Doba schnutí však závisí na typu papíru a naneseném objemu krve [75, 79, 80].

Po vysušení by vzorky DBS měly být chráněny před vlhkostí. Pak mohou být skladovány při pokojové teplotě po mnoho týdnů, měsíců nebo let, v závislosti na stabilitě analytu. Nicméně vzorky, které obsahují nestabilní sloučeniny, by měly být skladovány při nižší teplotě. DBS jsou často skladovány při přepravě v uzavřeném sáčku s vysoušedlem a uchovávány při nízkých teplotách (např. při biobankovnictví) [81-83].

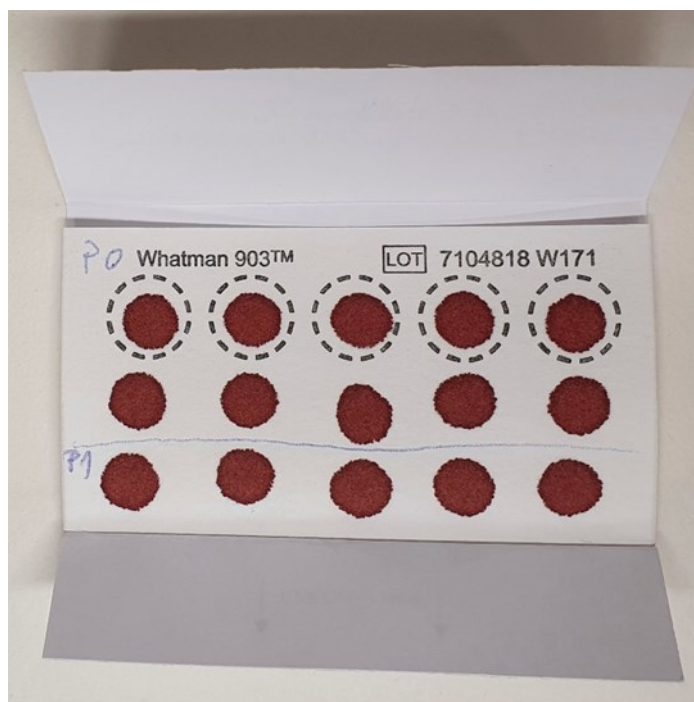
Uchovávání v biobance po delší dobu může vést k destabilizaci analytů. Například standardní protokol pro určení virové zátěže HIV (z angl. human immunodeficiency virus) vyžaduje skladování vzorků DBS při teplotě nižší než -20 °C maximálně 2 roky, nebo ne déle než 14 dnů při pokojové teplotě. Podobná doporučení jsou také popsána pro skladování vzorků DBS používaných při screeningu novorozenců a dalších klinických testech [84, 85].

Teplota a vlhkost přímo ovlivňují správnou analýzu aminokyselin a metabolitů rutinně stanovovaných v rámci novorozeneckého screeningu. Pro tento případ by vzorky DBS měly být skladovány při teplotách nižších než -20 °C. Uchovávání při nižších teplotách ale není řešením pro všechny analyty [86, 87]. Při analýze aktivity enzymů pro diagnostiku lysozomálních poruch u novorozenců, se aktivita enzymů významně snižuje, jsou-li vzorky skladovány při teplotě vyšší než 4 °C [88, 89].

1.2.1.1 Odběrové karty pro techniku suché kapky krve

Odběrové karty pro techniku DBS mají celulóзовou (filtrační papír) nebo necelulóзовou matici o specifické velikosti a tloušťce pórů [75]. Komerčně jsou dostupné různé formáty odběrových karet. Vhodný výběr odběrové karty je založen na vlastnostech analytu a jeho požadavcích na stabilizaci, účinnosti extrakce a metodě analýzy. Mezi základní formáty odběrových karet patří papírové odběrové karty Whatman 903 používané při novorozeneckém screeningu, Ahlstrom 226, a speciální odběrové karty Flinders Technology Associates (FTA) Drug Metabolism and Pharmacokinetics (DMPK), které jsou impregnovány látkami pro lýzu buněk a látkami stabilizující analyty. Odběrové karty FTA Elute jsou pak určeny zejména pro odběr a purifikaci DNA [75, 90-92].

Jedním z populárních formátů je odběrová karta Whatman 903 (obrázek 5), která je vyrobena z filtračního papíru, který je umístěn v pevném kartonovém rámu pro manipulaci a značení. Na filtračním papíru je vyznačeno pět kruhů pro aplikaci vzorku [93].



Obrázek 5: Odběrová karta Whatman 903®

Necelulózové odběrové karty jsou výhodné pro metody založené na hmotnostní spektrometrii (MS, z angl. mass spectrometry). V některých případech je nutné použít antikoagulanty (heparin, EDTA, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid), ty však mohou u metod založených na MS způsobovat interferenci [75, 92].

1.2.1.2 Extrakce a analýza analytů ve vzorcích získaných technikou suché kapky

Vysušené biologické tekutiny na odběrové kartě lze získat vyseknutím terčičku s definovaným průměrem různými děrovacími nástroji, ručními, poloautomatickými a automatickými. Pokud nevzniká potřeba opakovaně analýzy nebo archivace vzorku, lze použít i celá kapka. Analyty z vyseknutých terčičků lze získat přímo (mikrofluidické metody) nebo extrakcí vhodným extrakčním rozpouštědlem. Extrakční rozpouštědlo by mělo být optimalizováno podle profilu rozpustnosti analytů s ohledem na minimalizaci extrakce interferujících endogenních nečistot. Po extrakci jsou vzorky podrobeny analýze vhodnou analytickou technikou [92, 94, 95].

Pro analýzu analytů ve vzorcích získaných technikou DBS je důležité použít vnitřní standard (IS, z angl. internal standard). Jednou z možností je společná extrakce IS a analytu, nebo je IS aplikován přímo k analyzovanému vzorku [96].

1.2.1.3 Automatizace při technice suché kapky krve

V současné době je kladen velký důraz na co největší míru automatizace při odběru vzorku, extrakci i analýze. Některá automatizační řešení mohou extrahovat vzorek kontinuálním protékáním eluentu přes filtrační papír s odebraným vzorkem bez vyražení terčiku [97].

Jsou k dispozici také komerční přístroje pro plně automatizované online vzorkování a analýzu vzorků DBS, jako ABS2 (Instech Solomon, Pennsylvania, USA) a Culex (BASi, Indiana, USA). Deglon a kol. (2009) inovovali online analytickou metodu, ve které lze analyty ve vzorcích DBS analyzovat online desorpceí terčiku v nerezové cele. Tato online metoda má velký potenciál díky snížení různých kroků bioanalýzy, jako je centrifugace, extrakce, vortexování a další [75].

Automatizaci zahrnující aplikaci IS před extrakcí vyvinula švýcarská společnost CAMAG. DBS-MS 500 umožňuje plně automatické rozpoznávání vzorků, přidání IS k DBS vzorku a přímou extrakci analytů ze vzorku DBS. Extrakt je veden online do zvoleného analytického systému (tj. MS), celý systém je po každé extrakci vyčištěn [75-77].

1.2.2 Historie techniky suché kapky krve

Technika DBS byla poprvé popsána v roce 1913 Ivarem Christianem Bangem, který ji použil pro sledování koncentrace glukózy v krvi králíků. O půl století později, v roce 1963, se Robertu Guthriemu (1916-1995; Buffalo, New York) a Susimu podařilo vyvinout metodu pro semikvantitativní analýzu fenylalaninu pro screening novorozenců na fenylketonurii (PKU, z angl. phenylketonuria) s využitím bakteriálního inhibičního testu. Ten byl v roce 1965 zaveden celoplošně, a Guthrie se tak stal zakladatelem novorozeneckého screeningu. Zahájení celoplošného screeningu si vyžádalo formulování obecných pravidel pro jeho provádění, což učinili Wilson a Junger v roce 1968 [81, 98, 99-101]. Také v ČR byl jako první zaveden novorozenecký screening PKU. Příprava a spuštění tohoto screeningu jsou spojeny se jmény doc. MUDr. Blehové, CSc. a prof. MUDr. Hyánka, DrSc. [101].

V 70. letech 20. století byla technika DBS implementována do diagnostiky syfilis a detekce protilátek proti příušnicím a spalničkám. Kvůli nárůstu počtu onemocnění HIV získala na začátku roku 2000 technika DBS pozornost pro monitorování infekce HIV [102, 103].

MS pro analýzu analytů ze vzorků DBS byla poprvé použita v roce 1976 při kvantifikaci volných mastných kyselin. Pro analýzu malých těkavých molekul bylo o deset let později použito spojení MS s plynovou chromatografií (GC, z angl. gas chromatography) [79, 104].

1.2.3 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve

V posledních letech nabývá použití techniky DBS na významu, protože tato metoda vykazuje velké výhody ve srovnání s konvenčním odběrem a analýzou vzorků krve nebo plazmy. Tyto výhody zahrnují potřebu výrazně nižších objemů krve a snazší přepravu (vzorky mohou být zaslány do centralizovaných laboratoří k analýze prostřednictvím standardní poštovní zásilky), likvidaci a skladování, zejména při okolních teplotách, a navíc je odběr vzorků DBS minimálně invazivní (vhodný pro novorozence, malé děti a starší lidi). To vede ke zjednodušení procesu odběru krve a výraznému snížení nákladů s tím spojených. Dále lze v preklinických studiích snížit počet pokusných zvířat. Dalšími výhodami jsou zlepšená klinická spolupráce ve větších klinických studiích i u hůře dostupných populací a snížení expozice infekčním agens laboratorních pracovníků. V neposlední řadě umožňuje zjednodušené ukládání do biobank pro retrospektivní analýzu [75, 76, 79, 80, 82, 105, 106].

Technika DBS je užitečný nástroj v mnoha odvětvích, avšak stále nenahradil konvenční vzorky plné krve, plazmy nebo séra, neboť má určitá omezení, zejména stabilitu a schopnost poskytovat kvantitativní výsledky. Také doba schnutí je poměrně dlouhá, v závislosti na podmínkách, jako je typ odběrové karty a objem krve. Krev může také koagulovat nebo lyzovat, čímž se její rozložení na papírové odběrové kartě liší. Viskozita krve má podobný dopad na distribuci krve na odběrové kartě a výsledky pak mohou být nespolehlivé. Vzhledem k malému objemu odebrané krve může být nemožné detekovat více léčiv najednou. Dalším omezením techniky DBS je fakt, že ji lze kombinovat pouze s vysoce citlivými analytickými metodami a je neadekvátní pro analyty citlivé na vzduch nebo pro těkavé analyty [92, 102, 107].

Zdroje variability zahrnují interindividuální rozdíly se zvláštním důrazem na hodnotu hematokritu (Htc), rozdíly v množství analytu mezi kapilárním a žilním systémem, typ odběrové karty, heterogenitu v rámci jedné suché kapky (zejména pokud se pro analýzu použije pouze její část), podmínky skladování, přepravy a archivace a metody přípravy vzorků [108-112].

Převládajícím zdrojem variability mezi různými subjekty je hodnota Htc. Ta se může lišit podle věku, pohlaví, zdravotního stavu, životního prostředí a stavu výživy. Z chemického

a fyzikálního hlediska by měl vzorek krve se zvýšenou hodnotou Htc zvýšenou viskozitu kvůli vyššímu procentu erytrocytů (ERY) a viskózní kapka krve by se měla méně homogenně rozptýlit na filtračním papíru ve srovnání se vzorkem s nižší hodnotou Htc [108]. Jednou z možností zmírnění vlivu hodnoty Htc je kontrola celkového objemu krve deponované na kartu DBS nebo použití celé suché kapky krve k analýze. Pokud není použit celý vzorek DBS, měl by se terčík vysekávat ze stejného místa, například vždy uprostřed vzorku DBS [113-115].

1.2.4 Klinické využití techniky suché kapky krve

Typickou oblastí použití techniky DBS je novorozenecký screening. Technikou DBS je také umožněno sledování pacientů s vrozenými metabolickými poruchami, terapeutické monitorování léků (TDM, z angl. therapeutic drug monitoring) zejména u novorozenců a testování možného zneužívání regulovaných látek. Další užití techniky DBS jsou v odvětvích metaboliky, preklinické a klinické farmakokinetiky, toxikokinetiky, forenzních, biologických a imunologických věd [75, 79, 116, 117].

1.2.4.1 Novorozenecký screening

„Novorozenecký screening (NS) je aktivní a celoplošné (celostátní) vyhledávání chorob v jejich časném, preklinickém stadiu tak, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit dítěti nevratné poškození zdraví. Spočívá ve screeningu onemocnění na základě stanovení koncentrace specifické látky (event. i průkazu genové mutace) v suché kapce krve na filtračním papírku, tzv. novorozenecké screeningové kartičce, která je odebírána všem novorozencům na území státu.“ [101].

V České republice se od 1. 6. 2016 vyšetřuje 18 onemocnění, mezi které patří např. kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplazie, cystická fibróza (CF), PKU, nebo dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin stanovované metodikou tandemové hmotnostní spektrometrie, která může zachytit dalších přibližně 20 onemocnění [101].

Screening se provádí rozbořením krve odebrané z patičky novorozence na speciální filtrační papír. Vzorek odebírá zdravotník, obvykle v porodnici, během prvních 24-48 hodin života [118, 119]. S použitím techniky DBS je možné získat dostatek DNA pro identifikaci mutací v rámci NS s využitím polymerázové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain

reaction). Jediným novorozeneckým screeningovým testem, který v současnosti využívá analýzu DNA ze vzorků DBS je diagnostika CF [120, 121].

1.2.4.2 Sérodiagnostika

Technika DBS se používá také pro detekci protilátek jako ukazatelů infekčních onemocnění včetně virových patogenů a bakteriálních infekcí (tetanus, leptospiróza, brucelóza, leishmanióza). Diagnostiku infekčních poruch založenou na DNA lze provádět detekcí nukleových kyselin eluovaných ze vzorků DBS metodou PCR. Jedná se například o detekci lidského cytomegaloviru, diagnostiku HIV, viru *Herpes simplex*, hepatitidy B, hepatitidy C, atd. Navíc byla také prokázána vhodnost použití tohoto levného a účinného přístupu pro monitorování hormonálního stavu a potravinových intolerancí [122-126].

1.2.4.3 Další aplikace

V současné době se důkladně studuje možnost detekce protilátek proti SARS-CoV-2 (taxonomické označení druhu koronaviru; z angl. severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). Četné studie prokázaly účinnost techniky DBS při detekci protilátek s přesností srovnatelnou se vzorky séra nebo plazmy. Tato metoda je levnější a jednodušší, takže může být široce používána při pandemii. Může být použita nejen k potvrzení infekce, ale také k testování protilátkové odpovědi stimulované vakcínou [127-129].

Kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS, z angl. liquid chromatography with tandem mass spectrometry) se pro analýzu vzorků DBS v biochemické genetice používá od 90. let 20. století a bylo prokázáno, že může významně přispět ke studiu a diagnostice komplexních metabolických onemocnění, jako je například diabetes 2. typu [130, 131].

1.3 Stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích

1.3.1 Úprava vzorku před vlastní analýzou

Tokoferoly se v důsledku jejich lipofilního charakteru často nacházejí v biologických vzorcích spojených se strukturami, jako jsou buněčné membrány, lipoproteiny a tukové kapénky. Tato skutečnost téměř vylučuje přímé dávkování neupraveného vzorku do analytického systému. Je tedy nutné optimalizovat úpravu vzorku před vlastní analýzou. Výběr vhodného postupu přípravy vzorku hraje velmi důležitou úlohu, protože může ovlivnit dobu analýzy, citlivost metody a náklady na celou analýzu [132].

Aby byly α -tokoferol a další tokoly uvolněny z biologické matrice, musí být v některých případech použita speciální úprava vzorku. Jedná se o precipitaci bílkovin, saponifikaci, přidání antioxidantů pro stabilizaci α -tokoferolu, přidání vnitřního standardu a extrakci [133].

1.3.1.1 Precipitace bílkovin

Běžným způsobem uvolňování tokoferolů z makromolekul je precipitace proteinů. Provádí se obvykle přidáním organického rozpouštědla k biologické matrici. Obvykle se používá methanol [134], ethanol [133], butanol a acetonitril [135], nebo dodecylsulfát sodný (SDS) [136]. Běžně používané objemové poměry vzorku k precipitačnímu rozpouštědlu jsou 1:1, 1:2, 1:4 a 1:5 (v/v). V důsledku vysoké polaritě těchto rozpouštědel může docházet ke spolusrážení tokoferolů, což vede k jejich ztrátám [132]. Proto se jako vhodnější precipitační rozpouštědlo používá ethylacetát [137], směs ethanolu s ethylacetátem [138], butanol [139], butanol s ethylacetátem [139], hexan [139], nebo tetrahydrofuran [140]. Účinnost precipitace proteinů může být podpořena nízkými teplotami (4 °C), ledovou lázní, intenzivním třepáním, sonikací a vícenásobným opakováním [132]. Tokoferoly v supernatantu jsou následně extrahovány, existuje pouze několik metod využívajících jednostupňovou precipitaci proteinů pro extrakci α -tokoferolu z plazmy a séra [139].

1.3.1.2 Saponifikace

V případě některých matric (např. plodová voda, ERY, krevní destičky nebo mateřské mléko) následuje po precipitaci proteinů saponifikace, někdy označována jako zmýdelnění, nebo mikrosaponifikace, pro eliminaci interferencí makromolekul hydrofobní povahy. Proces saponifikace je nejběžněji prováděn 2 nebo 10 mol/l hydroxidem draselným při pokojové nebo zvýšené teplotě (obvykle 30 minut v teplotním rozmezí 60-80 °C). Silná saponifikace však

může mít za následek špatnou výtěžnost a ztrátu analytů a většinou není nutná pro extrakci tokoferolů ze séra nebo plazmy [133, 141]. Po saponifikaci jsou nezmýdelnitelné komponenty obsahující tokoferoly extrahovány do organické fáze a ostatní potenciálně interferující sloučeniny přecházejí do alkalické vodné fáze [133].

1.3.1.3 Antioxidanty

Degradace tokoferolů během přípravy vzorku, nejčastěji při saponifikaci a působení vysokých teplot, může být snížena přidáním antioxidantů, jako například butylovaného hydroxytoluenu [139], kyseliny askorbové [142, 143], pyrogallolu [144], stejně jako jejich kombinací [133, 145].

1.3.1.4 Vnitřní standard

V důsledku náročné extrakce tokoferolů z biologického materiálu se pro korekci extrakčního postupu doporučuje použít IS. Obecně by IS měl mít podobnou strukturu jako analyt, ale nesmí být přítomen v biologických matricích. Přidání IS by mělo eliminovat změny v dávkovaném objemu a ztráty analytu během preanalytické fáze. Používané IS zahrnují tokol (demetylovaná chromanolová forma tokoferolu), α -tokoferolacetát [146], retinylacetát [147], δ -tokoferol [148] a xantofyl [149]. Nejčastěji se používá tokol, který se jeví jako ideální IS. Zvláštní kategorii tvoří značené IS isotopem, které jsou užívané pro MS [132, 133].

1.3.1.5 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (LLE, z angl. liquid-liquid extraction) je vhodná technika pro extrakci tokoferolů z biologických matric kvůli jejich lipofilní povaze a její jednoduchosti. Kromě toho má tato technika ale řadu nevýhod, jako například velkou spotřebu organických rozpouštědel a vzorku. Z těchto důvodů je LLE často považována za nešetrnou k životnímu prostředí. Dnes se často volí miniaturizovaná verze metody LLE, která obvykle vyžaduje 100 nebo 200 μ l organického rozpouštědla. Extrakce tokoferolů metodou LLE byla popsána například pro vzorky plazmy, krvinek, moči a dalších biologických vzorků. Jako extrakční rozpouštědlo se téměř výhradně používá hexan (samostatně nebo s malým množstvím ethanolu, ethylacetátu nebo diisopropyletheru), a to v typickém objemu 0,5-2,0 ml [132]. Po extrakci tokoferolů v nepolární fázi se hexanová vrstva odstraní a odpaří pod proudem dusíku [142, 148] nebo ve vakuu [141].

Některé z dalších hojně užívaných rozpouštědel jsou methanol [150], isopropanol [151], aceton [152], diethylether [153] a ethanol [154]. Když je pro extrakci používán hexan, následuje chromatografie s reverzní fází, rozpouštědlo musí být odpařeno a nahrazeno jiným, více podobným mobilní fází, nebo přímo jí [133]. Extrakce může být také zlepšena například vortexováním, použitím ultrazvuku [155, 156], nebo horkých cirkulujících rozpouštědel, jako u Soxhletovy extrakce [157].

1.3.1.6 Extrakce na pevné fázi

Aplikace extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. solid phase extraction) nebo jiných purifikačních systémů na pevné fázi se používá při stanovení tokoferolů v různých matricích, mnohdy se používá při analýze plynovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (GC-MS, z angl. gas chromatography-mass spectrometry), nebo kapalinovou chromatografií spojenou s hmotnostní spektrometrií (LC-MS, z angl. liquid chromatography-mass spectrometry). V literatuře bylo popsáno použití křemeliny a sorbentů C₁₈ a C₈, použití kolon s vázanou fází (aminopropyl) nebo lipofilní gelové chromatografie [158-160].

SPE je extrakční technika, která je finančně a časově náročná, její výhodou je možnost automatizace a miniaturizace. Nové přístupy poskytují krátkou dobu extrakce, kdy se používají pouze malá množství vzorků a rozpouštědla. V minulosti byla pro extrakci tokoferolů technika SPE méně využívána ve srovnání s technikou LLE [132].

Mezi sorbenty na pevné fázi používané pro extrakci isomerů tokoferolu patří C₈ Strata, C₁₈ Speed, C₈ Alltech, C₁₈ HLB Oasis (polymerní patrony), C₆H₁₁ a C₄. Na pevnou fázi se aplikují různé objemy vzorků v závislosti na typu matrice: 0,25–1,00 ml séra a 0,5 ml ERY. Jako eluční rozpouštědla se používají isopropanol, methanol a hexan. Pro proces odpařování obvykle volí vakuový odpařovač, odparek je zpravidla rozpuštěn v alkoholu (methanol, ethanol) nebo přímo v mobilní fází [135, 159, 161].

Mezi nové SPE techniky se řadí miniaturizovaná SPE, neboli extrakce v pevné fázi s použitím nanovláken (PFSPE, z angl. packed fibre solid-phase extraction), online SPE a nakonec byla vyvinuta také plně automatizovaná metoda extrakce α -tokoferolu ze séra [158, 162, 163].

Analýzu může ovlivnit zvolené rozpouštědlo pro extrakci, doba extrakce, purifikace vzorku a další. K purifikaci před analýzou HPLC (z angl. high-performance liquid

chromatography) se používá například chromatografie na tenké vrstvě (TLC, z angl. thin layer chromatography), SPE, nebo extrakce superkritickou kapalinou (SFE, z angl. supercritical fluid extraction), což je novější trend extrakce s velkým potenciálem [133].

1.3.2 Konkrétní aplikace úpravy vzorků pro jednotlivé biologické matrice

1.3.2.1 Plazma a sérum

Krev se odebírá do zkumavek s EDTA pokrytých hliníkovou fólií kvůli ochraně před světlem. Plazma se odděluje od krevních buněk centrifugací a je skladována při -80 °C v tmavých polypropylenových zkumavkách. Bylo zjištěno, že tokoferoly a IS ve vzorcích plazmy jsou stabilní při 4 °C po dobu alespoň 8 hodin [164].

Extrakce α -tokoferolu z lidské plazmy se provádí technikou LLE [165], a to hexanem [165, 166, 167], nebo směsí methanol-hexan [168]. Jako precipitační činidlo se užívá SDS [165], vychlazený ethanol (-20 °C) [164, 166] nebo směs acetonitrilu a isopropanolu [165]. Jako IS se používá tokol [165], α -tokoferolacetát [164, 166], LCM (5TE-13'-COOH) [168], nebo izotopově značené IS pro LC-MS analýzu [169]. Jako antioxidanty se přidávají butylovaný hydroxytoluen [165, 168] a kyselina askorbová [168].

Příprava vzorků plazmy zahrnuje přidání roztoku IS v ethanolu, precipitaci proteinů, techniku LLE s přidáním antioxidantu, centrifugaci, odpaření organického rozpouštědla v atmosféře dusíku nebo ve vakuové odparce a rozpuštění odparku v rozpouštědle co nejvíce podobnému mobilní fázi. Vzorek se přefiltruje přes nylonový filtr (0,20 μ m), přenesení do vialky z tmavého skla a probublá čistým dusíkem (odstranění kyslíku před uzavření vialky víčkem). Všechny kroky se provádějí v zatemněné místnosti. Vzorek je poté dávkován do systému HPLC [164, 165].

Tokoferoly se ze séra extrahují směsí methanol/isopropanol (80/20, v/v), n-hexanem [170, 158] nebo směsí butanol/ethylacetát [171], precipitačním činidlem bývá methanol [158] a jako antioxidant se používá butylovaný hydroxytoluen [171].

1.3.2.2 Erytrocyty a další krevní buňky

Krevní destičky, lymfocyty, polymorfonukleární leukocyty a erytrocyty jsou z odebrané krve prvně izolovány. Krev je nejprve odstředěna a je oddělena plazma bohatá na krevní destičky. Krevní destičky jsou peletovány centrifugací a třikrát promyty fyziologickým roztokem obsahujícím fosfátový pufr (PBS, z angl. phosphate buffered saline) o pH 7,4 a obsahujícím

EDTA, aby se zabránilo shlukování destiček. Promyté destičky jsou resuspendovány v PBS a alikvoty extrahovány a analyzovány. Erytrocyty se promývají fyziologickým roztokem. Tokoferoly jsou ze vzorku erytrocytů extrahovány hexanem s přidáním butylovaným hydroxytoluenem po předchozí precipitaci proteinů vychlazeným ethanolem nebo methanolem. Jako IS se používá tokol. Další postup je stejný jako v případě stanovení tokoferolů v plazmě nebo séru [165, 172, 173].

1.3.2.3 Další biologické vzorky

Hladiny α -tokoferolu v mateřském mléce se stanovují především kvůli výživě předčasně narozených dětí. Vzorky mateřského mléka jsou po rozmrazení homogenizovány za stálého míchání na vodní lázni zahřáté na 37 °C. Jako antioxidant se používá kyselina askorbová, precipitace proteinů se provádí ethanolem a saponifikace hydroxidem draselným za horka. α -Tokoferol je extrahován hexanem. Další postup je stejný jako v případě stanovení tokoferolů v plazmě nebo séru [174].

Ve stolici a moči se stanovují hladiny metabolitů vitamínu E. Přibližně 30 mg vzorku stolice se homogenizuje ve 2 ml methanolu s přidanou kyselinou askorbovou (0,2 mg/ml). Po odstředění je organická vrstva odpařena v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn v methanolu. Jako IS se používá LCM, stejně jako v případě stanovení metabolitů vitamínu E v moči [168].

Byla popsána také metoda LC-MS/MS pro simultánní stanovení vitaminů rozpustných v tucích v plodové vodě. Ke vzorku plodové vody se přidá acetonitril s IS, obsah zkumavky je odstředěn a supernatant přenesen do vialky [175].

1.3.3 Metody stanovení α -tokoferolu

Většina studií zabývajících se stanovením tokoferolů se zaměřuje především na α -tokoferol a γ -tokoferol. V současné době stoupl zájem o stanovení všech tokoferolů. Fyzikální a chemické vlastnosti tokoferolů naznačují, že by mělo být dosaženo separace všech isomerů s výjimkou překrývajících se β - a γ -isomerů [132].

Vzhledem k tomu, že zásoby v těle a obsah vitamínu E v membránách je obtížné stanovit, používá se pro určení zásoby vitamínu E v těle koncentrace α -tokoferolu v krvi. Hladina α -tokoferolu je spojena s cirkulujícími lipidovými frakcemi, a proto je často uváděna ve vztahu k celkovým lipidům, LDL, cholesterolu nebo triacylglycerolům [176, 177, 178].

Tokoferoly lze stanovit v širokém spektru biologických vzorků, jako je sérum [154], plazma [145], moč [135], tkáň [143], krvinky [149], seminální plazma [179], plodová voda [141], stolice [154], mateřské mléko [148], mozkomíšní mok [180] a kolostrum [181].

Pro stanovení α -tokoferolu samostatně nebo společně s ostatními antioxidanty v plazmě či séru se používá celá řada chromatografických metod, jako GC, kapilární elektrochromatografie (CEC, z angl. capillary electrochromatography) a HPLC. GC-MS a CEC se používají pro stanovení různých forem tokoferolů v plazmě, bohužel jsou ale nepraktické pro rutinní praxi. GC-MS je časově náročná, neboť vyžaduje derivatizaci a u CEC je zase zapotřebí velkého objemu vzorku. Proto jsou v praxi nejvíce využívané metody HPLC. Ty mohou být také časově náročné, některé vyžadují precipitaci proteinů a extrakci organickým rozpouštědlem, to musí být před samotnou analýzou odpařeno a odparek rozpuštěn v mobilní fázi nebo rozpouštědlo podobnému mobilní fázi. Některé metody používají pouze krok precipitace proteinů a supernatant dávkuje přímo do HPLC systému. Tyto metody jsou však méně citlivé, zřejmě díky účinku matrice. První test využívající HPLC pro separaci vitamínů rozpustných v tucích popsal Vecchi a Oesterheld v roce 1973. Od té doby bylo vyvinuto několik analytických metod pro analýzu α -tokoferolu v biologických vzorcích [165].

Pro analýzu α -tokoferolu v lidském séru nebo plazmě jsou k dispozici různé metody detekce zahrnující UV-Vis (ultrafialová oblast, z angl. ultraviolet; viditelná oblast, z angl. visible) [182-184], fluorescenční [147, 185, 186] a MS detekci [169, 187, 188], případně další méně užívané.

1.3.3.1 Separace tokoferolů a tokotrienolů metodou HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je konvenční metodou pro stanovení tokoferolů. HPLC je pro stanovení tokoferolů vysoce specifická, citlivá, přesná a relativně rychlá, spotřeba organických rozpouštědel je malá a HPLC lze spojit s různými detektory. Pro separaci tokoferolů se používají kolony s normální (NP-HPLC, z angl. normal phase high-performance liquid chromatography) a reverzní (RP-HPLC, z angl. reversed phase high-performance liquid chromatography) fází [134, 164, 189].

Stanovení koncentrace α -tokoferolu v plazmě metodou HPLC používá různé mobilní fáze. Preferována je RP-HPLC s C_{18} stacionární fází, NP-HPLC se používá zřídka. Běžnými mobilními fázemi jsou například směs methanolu a vody, acetonitrilu a methanolu s přísadkou triethylaminu. Často se k methanolu přidává tetrahydrofuran. Analýza α -tokoferolu

se v různých biologických vzorcích liší. Při stanovení α -tokoferolu v tkáních se používá techniky NP-HPLC, separace je gradientová a mobilní fází je n-hexan, směs n-hexanu a 2-propanolu nebo směs methanolu a vody, případně dihydrogenfosforečnanu sodného. Při stanovení α -tokoferolu v buňkách byla jako mobilní fáze použita směs acetonitrilu, methanolu a vody s přídavkem kyseliny trifluoroctové [165].

Pro separaci všech osmi isomerů vitamínu E se používá NP-HPLC, pokud jde o separaci pouze některých isomerů, lze použít RP-HPLC [190].

Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC, z angl. ultra high-performance liquid chromatography) se od svého zavedení v roce 2005 stále více používá pro analýzu tokoferolů. Ve srovnání s klasickou HPLC umožňuje UHPLC provádět analýzu při vysokých tlacích (nad 40 MPa), a tím dosáhnout lepší účinnosti separace při použití kolon s velikostí částic pod 2 μm . Výsledkem je vyšší rozlišení, citlivost a rychlost analýzy. Vysoké náklady na kolony a potřeba specializovaného drahého hardwaru však často brání použití UHPLC pro stanovení tokoferolů v biologických vzorcích [183, 185, 191].

1.3.3.2 Detektory používané při metodách vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení tokoferolů

Nejběžnějšími detektory pro stanovení tokoferolů metodou HPLC, které se dnes používají, jsou detektory spektrofotometrické, nebo detektory s diodovým polem (DAD, z angl. diode array detector). DAD je pokročilejším UV/Vis detektorem běžně používaným k současnému a kontinuálnímu získávání UV/Vis spekter v širokém rozsahu vlnových délek, typicky 190-800 nm (512 fotodiod na desce). Má velký potenciál pro charakterizaci neznámých analytů ve srovnání s běžným UV/Vis spektrofotometrickým detektorem [192].

Tokoferoly lze také detegovat fluorescenčním detektorem (FLD, z angl. fluorescence detector). FLD jsou vysoce citlivé, mez detekce pro některé analyty je v řádu pikogramů, jsou tak daleko citlivější a selektivnější než UV/Vis spektrofotometrické detektory. α -Tokoferol přirozeně fluoreskuje, excitační vlnová délka je v rozmezí 290-298 nm a emisními 330-335 nm [132], nebo 290-296 nm a 325-330 nm [156]. Metoda HPLC-FLD byla použita pro stanovení α -tokoferolu v mnoha biologických matricích, jako jsou tkáně [188], ERY, leukocyty [172], plazma [172], nebo lipoproteiny LDL a HDL [194].

Stanovení tokoferolů metodou HPLC spojenou s elektrochemickým detektorem (ED, z angl. electrochemical detector) je vysoce citlivé a specifické. Navíc je možné také měřit oxidační produkty tokoferolů, což je velkou výhodou při studiu jejich úlohy při oxidačním stresu. Používá se jak amperometrická, tak coulometrická detekce. ED je nejvíce použitelný pro RP-HPLC. V mobilní fázi musí být přítomen elektrolyt, většinou se používají chloristan nebo chlorid zinečnatý [133]. Citlivost elektrochemických detektorů je v pikogramech [132]. Současným trendem v elektrochemické detekci je vývoj elektrochemických senzorů pro detekci vitamínů rozpustných v tucích [195].

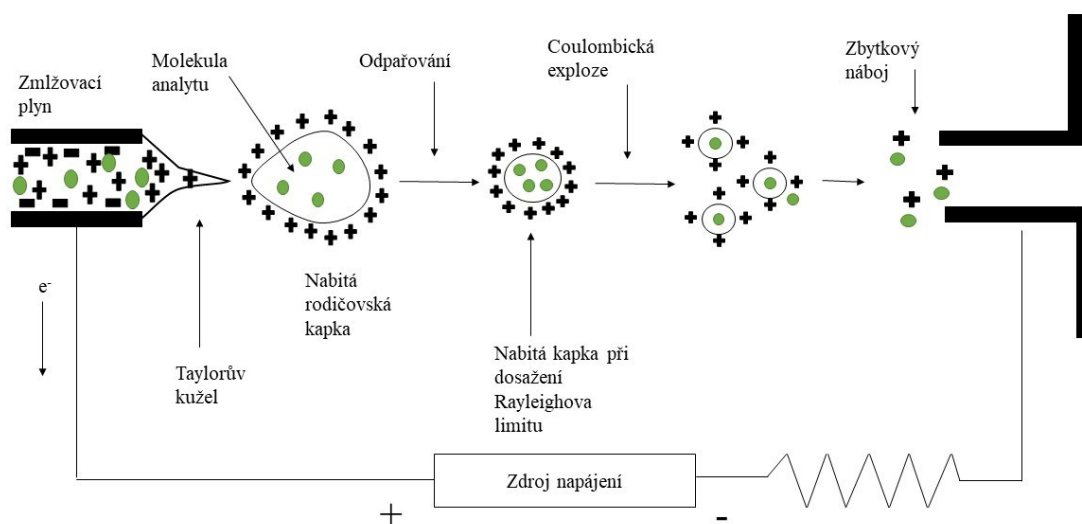
1.3.3.3 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí

Hmotnostní spektrometrie je výkonnou analytickou technikou používanou k identifikaci a kvantifikaci sloučenin na základě jejich molekulové hmotnosti. Tokoferoly a tokotrienoly jako nepolární látky s relativně nízkou molekulovou hmotností jsou ionizovány chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI, z angl. atmospheric pressure chemical ionization) nebo ionizací elektrosprejem (ESI, z angl. electrospray ionization) [137, 196].

APCI je ionizační technika pracující za atmosférického tlaku, která se řadí mezi tzv. měkké ionizační techniky. Podobá se chemické ionizaci, kde se primární ionty vytváří ve spreji rozpouštědla. APCI se užívá při analýze polárních a málo polárních tepelně stabilních sloučenin s molekulovými hmotnostmi do 1 500 Da. Analyty jsou převedeny do plynné fáze a následně ionizovány prostřednictvím reakčního činidla. V koronovém výboji je reakční činidlo ionizováno a při kontaktu s analytem dojde k přenosu náboje z jedné molekuly (reakčního činidla) na molekulu analytu v závislosti na elektronové afinitě molekul [197, 198].

ESI je ionizační technika pracující za atmosférického tlaku, která se řadí mezi tzv. měkké ionizační techniky, protože při ní dochází jen k minimální fragmentaci molekul. Poprvé byla popsána v roce 1984. Široké spektrum aplikací této metody je však omezeno na ionogenní a polární molekuly. Roztok s analytem je přiváděn do iontového zdroje kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí. Zmlžovacím plynem je roztok převeden na malé kapičky s nábojem. Takto vzniklé velké kapičky jsou působením sušícího plynu zmenšovány, čímž dochází ke zvětšování povrchového náboje. Po překročení kritické hodnoty povrchového náboje na kapičce dochází ke Coulombickým explozím, čímž vznikají menší kapičky, což vede až ke konečnému vzniku iontů, které jsou následně vtaženy do hmotnostního analyzátoru (obrázek 6) [199-201].

ESI vyžaduje zavedení elektrolytu do mobilní fáze nebo dodáním post-kolonově, aby se umožnila detekce přírodních tokochromanolů. ESI se často provádí s použitím pozitivního módu [168, 169, 175, 202, 203]. Pro stanovení α -tokoferolu byla také využita APCI v režimu pozitivní [138] nebo negativní ionizace [155, 204].

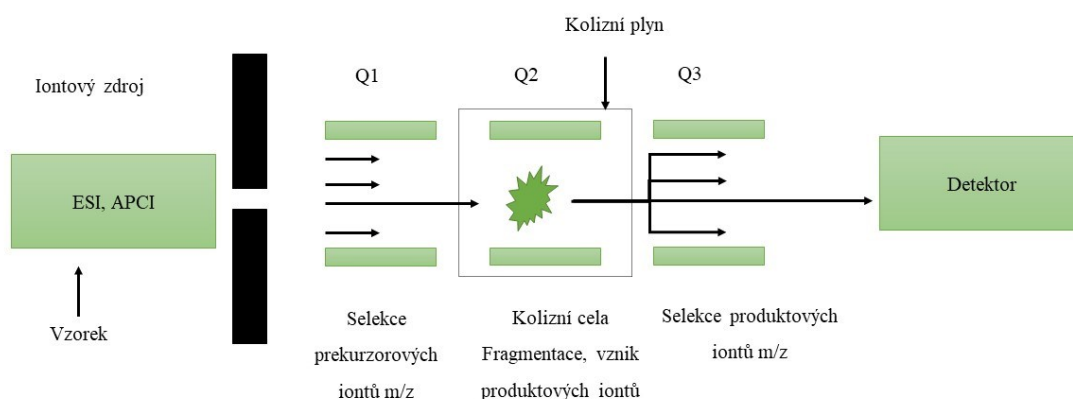


Obrázek 6: Schéma ionizace elektrosprejem, převzato a upraveno z [205]

Jedním z konvenčních analyzátorů běžně používaných pro stanovení tokolů je kvadrupól (Q, z angl. quadrupole) nebo lineární iontová past. V mnoha případech se uplatňují analytické metody s použitím tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), k tomu se využívá kvadrupól spojený s dalším kvadrupólem, s lineární iontovou pastí (QTRAP) [180] nebo s analyzátozem doby letu (QTOF, z angl. quadrupole time-of-flight) [206, 207].

V rámci všech hmotnostních analyzátorů se v kvantitativním stanovení tokochromanolů jeví jako nejvýhodnější iontové pasti s nejnovějšími modifikacemi a také trojitě kvadrupólové analyzátoři (QqQ) (obrázek 7) [187, 202], a to díky jejich zvýšené citlivosti a selektivitě, které zajišťují získání přesných výsledků [206]. Nejvíce se využívá mód multiplexní analýzy (MRM, z angl. multiple reaction monitoring) [168, 202, 203, 210], méně pak mód monitorování vybrané reakce (SRM, z angl. selected reaction monitoring) [138]. MRM je vysoce specifická a citlivá technika pro kvantifikaci analytů. Principem MRM s využitím QqQ je sledování specifického přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem daného analytu. Analyty jsou převedeny na ionty v iontovém zdroji a vedeny na první kvadrupól. Ten slouží jako hmotnostní filtr pouze k izolaci iontů se zvolenou hmotností m/z (tzv. prekurzorový iont). Druhý kvadrupól slouží jako kolizní cela, kde dochází na základě zvolené kolizní energie k rozbití molekuly na jednotlivé fragmenty (tzv. produktové ionty). Třetí kvadrupól funguje

jako druhý hmotnostní filtr pro specifikované fragmenty. Vzniklé produktové ionty jsou detekovány detektorem [208, 209, 211-213].



Obrázek 7: Schéma trojitého kvadrupólu jako hmotnostního analyzátoru, převzato a upraveno z [214]

Metodou LC-MS nebo LC-MS/MS byl α - tokoferol nebo jeho metabolity a další tokoly stanoveny v různých biologických matricích, jako například plazmě [169, 210], séru [138], stolici a moči [210], nebo plodové vodě [175]. Jako IS se používají α -CMBHC (z angl. 5-(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-yl)-2-methyl-pentanoic acid) [210] nebo izotopově značené IS [169, 187, 203]. Nejvíce používanými kolonami jsou kolony s RP [168, 169, 210], eluce je často gradientová [168, 169, 202, 207, 210]. Při užití MS detekce je potřeba upravit složení mobilní fáze. Musí se používat těkavé pufrů, jako například octan amonný [202, 210], mravenčan amonný [169] nebo kyselina mravenčí [168], a směsi rozpouštědel podporující ionizaci, jako například acetonitril [210], isopropanol [207] nebo methanol [138, 169, 202].

1.3.4 Další techniky a metody pro stanovení tokoferolů v biologických vzorcích

Další možnou chromatografickou technikou, která našla uplatnění při separaci a kvantitativní analýze vitamínů rozpustných v tucích i ve vodě, je chromatografie využívající superkritický CO_2 jako mobilní fázi. CO_2 se vyznačuje snadno dosažitelnými kritickými parametry (31 °C

a 7,4 MPa) a nízkou viskozitou a vysokou difuzivitou. Jako kolony se používají kolony plněné silikagelem (normální fáze) [215].

Existuje také celá řada dalších metod pro stanovení tokoferolů v biologických vzorcích, které jsou ale mnohdy časově náročné. Jedná se o metody ELISA (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay) [216], papírové chromatografie [217], chromatografie na tenké vrstvě [218], nebo HPLC spojená s detektorem rozptylu světla [133]. Ve výčtu použitých metod pro stanovení tokoferolů v biologických vzorcích by neměla chybět ani Ramanova mikroskopie pro zobrazení distribuce α -tokoferolu v buňkách a tkáňových řezech [219]. Mezi novější metody pro stanovení α -tokoferolu v séru patří metoda založená na optickém senzoru [220].

1.3.4.1 Plynová chromatografie

Spojení GC s plamenově ionizačním detektorem (FID, z angl. flame ionization detector) je technika, která se pro stanovení tokoferolů již dnes tolik nepoužívá. Příprava vzorku zahrnuje saponifikaci za tepla, separaci TLC a derivatizaci za vzniku odpovídajících trimethylsilylderivátů. Trimethylsilylderiváty tokoferolů mohou být ještě před nadávkováním na kolonu purifikovány technikou SPE [133, 221]. Byly také popsány metody GC-FID pro stanovení tokoferolů bez předchozí derivatizace [222].

Při stanovení tokoferolů a tokotrienolů technikou GC-MS musí být tyto sloučeniny díky jejich lipofilním vlastnostem separovány za použití relativně nepolárních chromatografických stacionárních fází. Ve většině případů se používá tavený oxid křemičitý s navázanými dimethylovými a fenylovými skupinami. V případě tokolových derivátů jsou široce používány 5% fenyl a 95% dimethylpolysiloxanové fáze [158].

Vzhledem k přítomnosti knihoven sloučenin založených na fragmentaci při energii elektronů 70 eV, je ionizace dopadem elektronů (EI, z angl. electron impact) výhradně používanou ionizační technikou. Díky EI poskytuje fragmentace ve zdroji strukturní informace vhodné pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. GC-MS analýza derivátů tokolů se obvykle provádí kvadrupólovým analyzátozem v režimu plného MS skenu (full scan) nebo módu monitorování vybraného iontu (SIM, z angl. selective ion monitoring) [158, 223].

CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat přípravu vzorku suché kapky krve a validovat metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu v plné krvi získanou technikou suché kapky krve tak, aby byla co nejvíce citlivá, specifická a rychlá.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

- α -Tokoferol-D₆ 500 $\mu\text{g/ml}$ ($\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{D}_6\text{O}_2$), Mr 436,74 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- α -Tokoferolacetát ($\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_3$), Mr 472,74 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Acetonitril hypergrade pro LC-MS ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$), Mr 41,05 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Butylovaný hydroxytoluen (BHT; $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$), Mr 220,40 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda (H_2O), Mr 18,00; G = 0,055 μS
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Mr 46,07 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS (CH_2), Mr 46,03, w = 0,98-100,00 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methanol (CH_4O), Mr 32,04 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Methyl-*terc*-butylether ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), Mr 88,15 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- n-Hexan (C_6H_{12}), Mr 86,18 (Merck, Darmstadt, Německo)

2.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy AdventurerTM Pro AV114C (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Centrifuga EPP-5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)
- Děrovací kleště, pinzeta
- Odběrová karta Whatman 903TM (Whatman, GmbH, Dassel, Německo)
- Kádinky, odměrné válce, odměrné baňky, zkumavky
- Kapalinový chromatograf (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
 - Autosampler SIL-20AC
 - Hmotnostní detektor LCMS 8045
 - Odplyňovač mobilní fáze DGU-20A

- Řídicí systém CBM-20A
- Software LabSolutions, verze 5.97 SP1
- Termostat kolon CTO-40C
- Vysokotlaká čerpadla LC-20AD
- Kolona Discovery[®] HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μm), opatřená ochrannou kolonou Discovery[®] HS F5 (4 × 2,1 mm; 3 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Kolona Ascentis[®] Express C18, 5 μm, 150 x 4,6 mm, opatřená ochrannou kolonou Ascentis[®] Express C18, 5 μm, 5 x 4,6 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Odběrové zkumavky s K₃EDTA, 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
- Odstředivka Sorvall TC6 (Sorvall[®] Instruments, Newtown, CT, USA)
- Polypropylenové (PP) mikrozukavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 ml (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Rotační olejová vývěva CLASSIC VRO-4 (LAVAT, a.s., Radim u Kolína, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Skleněné inserty (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Ultrazvuková čistička ECOSON (ECOSON, Nové Mesto nad Váhom, Slovensko)
- Spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Třepačka Reax top (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

2.3 Příprava zásobních a pracovních roztoků

Příprava 0,1% roztoku BHT

Pro přípravu 0,1% roztoku BHT bylo naváženo 0,025g BHT do 25 ml ethanolu.

Příprava 1% roztoku BHT

Pro přípravu 1% roztoku BHT bylo naváženo 0,25 g BHT do 25 ml ethanolu.

Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda o hodnotě elektrické vodivosti $G = 0,055 \mu\text{S}$ byla vyrobena zařízením na úpravu vody Smart2pure. Voda byla přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 μm .

Příprava zásobního roztoku α -tokoferolu o koncentraci asi 1200 $\mu\text{mol/l}$

Přibližně 5 mg α -tokoferolu bylo rozpuštěno v 10 ml ethanolu a na základě specifického extinkčního koeficientu byla vypočítána přesná koncentrace α -tokoferolu odpovídající jednotkové absorbanci (rovnice 1).

$E_{292}^{1\%} = 75,8$ (absorbance 1% roztoku α -tokoferolu v ethanolu při $\lambda = 292 \text{ nm}$)

$$c = \frac{\rho_{\text{EtOH}} \cdot w_x}{M_r} = \frac{789 \cdot 1,32 \times 10^{-4}}{430,7} = 2,417 \times \frac{10^{-4} \text{ mol}}{\text{l}} = 241,7 \mu\text{mol/l}$$

Rovnice 1: Výpočet koncentrace α -tokoferolu při jednotkové absorbanci

Na základě naměřené absorbance a vypočtené koncentrace, kdy je absorbance rovna jedné, byla vypočítána koncentrace zásobního roztoku α -tokoferolu (rovnice 2)

$$c = c (\text{při } A = 1) \times \text{absorbance} = 241,7 \times 0,236 = 57,0 \mu\text{mol/l}$$

Rovnice 2: Výpočet skutečné koncentrace zásobního roztoku α -tokoferolu

Před změřením absorbance byl zásobní roztok α -tokoferolu naředěn ethanolom 21x, aby absorbance odečtená na spektrofotometru byla v rozmezí 0,2-1,0, tedy výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 1198 $\mu\text{mol/l}$. Takto připravený zásobní roztok α -tokoferolu byl skladován při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Při přípravě pracovního roztoku byla vždy koncentrace zásobního roztoku ověřena spektrofotometricky.

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolu-D₆ v ethanolu

Zásobní roztok isotopicky značeného vnitřního standardu byl připraven rozpuštěním obsahu vialky o navážce 2 mg v ethanolu a doplněním do 100 ml. Koncentrace 20 mg/l odpovídá 45,8 μ mol/l. Roztok byl skladován při -80 °C.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolu-D₆ o koncentraci asi 12 μ mol/l

Pracovní roztok IS byl připraven ze zásobního roztoku α -tokoferolu-D₆ v ethanolu o koncentraci 45,8 μ M. Ten byl 4x naředěn ethanolem, čímž vznikl pracovní roztok IS o koncentraci přibližně 11,5 μ mol/l. Roztok byl uchováván při -20 °C ne déle než 1 měsíc.

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu o koncentraci asi 500 μ mol/l

Pro přípravu zásobního roztoku IS α -tokoferolacetátu bylo rozpuštěno 2,4 mg v 10 ml ethanolu, výsledná koncentrace byla 508 μ mol/l.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (I) o koncentraci přibližně 10 μ mol/l

Pracovní roztok α -tokoferolacetátu byl připraven ze zásobního roztoku α -tokoferolacetátu. Ten byl 50x naředěn ethanolem, čímž vznikl pracovní roztok o koncentraci asi 10 μ mol/l.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (II) o koncentraci asi 1 μ mol/l

Pracovní roztok α -tokoferolacetátu (I) byl 10x naředěn ethanolem.

Příprava elučního činidla (1 μ mol/l α -tokoferolacetát obsahující 0,1% BHT)

Pro přípravu 25 ml tohoto elučního činidla bylo smíseno 2500 μ l 1% BHT v ethanolu s 50 μ l pracovního roztoku IS α -tokoferolacetátu (II) a s 22450 μ l ethanolu.

Příprava směsi ethanolu a hexanu v poměru 1:1 (v/v)

Bylo smícháno 10 ml ethanolu s 10 ml hexanu.

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním ACN s deionizovanou vodou v poměru 83:17 (v/v) s přidavkem kyseliny mravenčí s výslednou koncentrací 0,1%. MF byla odvzdušněna 15 min v ultrazvuku.

2.4 Vzorky suché kapky krve

Vzorky krve byly odebrány technikou DBS od 30 dobrovolných dárců krve (16 žen a 14 mužů) ve věkovém rozmezí 18-67 let s průměrem 41,5 roku. Vzorky byly odebírány na odběrovou kartu Whatman #903, která byla předem ošetřena 0,1% BHT v ethanolu. Před zahájením odběru krve byl každý z dobrovolných dárců poučen o průběhu studie a podepsal informovaný souhlas.

2.4.1 Odběr plné krve a příprava vzorků pro validaci

Pro optimalizaci přípravy vzorků a validaci metody byla kvalifikovaným zdravotníkem odebrána venózní krev od jednoho dobrovolného dárce, který předem poskytl informovaný souhlas. Krev byla odebírána do zkumavek s K₃EDTA.

2.4.2 Odběr vzorků krve na odběrovou kartu

Prst dárce krve byl prokrven pod proudem teplé vody a následně důkladně vydezinfikován. Následoval vpich lancetou do prstu do hloubky asi 5 mm. První vzniklá kapka krve byla otřena buničinou a další kapka již byla nakapána na filtrační papír odběrové karty Whatman #903 ošetřený 0,1% BHT v ethanolu až do úplného prosáknutí vyznačeného terčíku z obou stran. Odběrová karta byla následně ponechána schnout při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a uchována v uzavřeném plastovém sáčku při -20 °C po dobu ne delší než jeden měsíc.

2.5 Příprava kalibrační řady standardů α -tokoferolu

Byla připravena sedmibodová kalibrační řada pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS. Koncentrace jednotlivých standardů jsou uvedeny v tabulce 1. Standardy S₁-S₆ byly připraveny smícháním plné krve se standardy o dané koncentraci v poměru 19:1 (v/v), tedy 285 μ l krve a 15 μ l standardu α -tokoferolu. Jednotlivé koncentrace standardů a jejich příprava jsou uvedeny v tabulce 1. Kalibrační standard S₀ (nulový standard) byl připraven smícháním plné krve s ethanolem v poměru 19:1 (v/v). Takto připravené kalibrační standardy plné krve byly nanášeny (25 μ l) na filtrační papír Whatman #903 ošetřený 0,1% BHT. Odběrová karta

s nanesenou krví byla následně ponechána schnout při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a uchována v uzavřeném plastovém sáčku při -20 °C po dobu ne delší než jeden měsíc.

Tabulka 1: Příprava jednotlivých kalibračních standardů pro sestavení kalibrační křivky

Standard	Koncentrace α -T v krvi ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Pracovní roztok α -T (509 $\mu\text{mol/l}$) (μl)	Ethanol (μl)
S ₁	0,51	10,2	10	490
S ₂	1,02	20,4	10	240
S ₃	2,55	50,9	20	180
S ₄	5,09	101,8	40	160
S ₅	10,18	203,6	80	120
S ₆	25,45	509,2	200	-

2.6 Příprava a zpracování vzorků pro optimalizaci metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve

2.6.1 Extrakce činidlem obsahujícím α -tokoferol-D₆ jako vnitřní standard

Pro optimalizaci extrakce bylo pipetováno na odběrovou kartu Whatman #903 ošetřenou 0,1% BHT 30 μl krve. Připravené vzorky byly ponechány zaschnout při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a skladovány v uzavřeném plastovém sáčku při -20 °C po dobu ne delší než jeden měsíc.

2.6.1.1 Volba extrakčního činidla

Pro extrakci bylo testováno 5 možných extrakčních činidel, a to konkrétně methanol, hexan, methyl-*terc*-butylether, směs ethanolu a hexanu v poměru 1:1 (*v/v*) a ethanol. Příprava směsi extrakčních činidel je popsána v kapitole 2.3. Ze vzorku DBS byl vyseknut terčík o průměru 6 mm, který byl pinzetou přenesen do zkumavky typu Eppendorf o objemu 1,5 ml. K terčíku vzorku DBS bylo přidáno 10 μl pracovního roztoku α -tokoferolu-D₆ (12 $\mu\text{mol/l}$), 200 μl extrakčního činidla a směs třepána na třepačce po dobu 20 min. Směs byla odstředěna (5 min, 2016 \times g), organická vrstva přenesena do čisté zkumavky a ke zbytku bylo přidáno opět 200 μl extrakčního činidla a extrakce opakována. Extrakční činidlo bylo opatrně odpařeno v atmosféře

dusíku, odparek byl rozpuštěn v 100 μl ACN a směs převedena do insertu vloženého ve skleněné vialce. Všechny vzorky byly zpracovány v duplikátu.

2.6.1.2 Doba a počet extrakcí

V rámci optimalizace extrakce byla také testována doba extrakce (5, 10, 20 a 30 min) a počet extrakcí 1-3. Postup extrakce byl stejný jako v kapitole 2.6.1.1, jen s různou dobou extrakce a počtem opakování extrakce.

2.6.1.3 Způsob extrakce

Pro zvýšení účinnosti extrakce bylo testováno třepání nebo sonikace po různě dlouhou dobu. Postup extrakce je popsán v kapitole 2.6.1.1.

2.6.2 Extrakce s činidlem obsahujícím α - tokoferolacetát jako vnitřní standard

Pro optimalizaci extrakce s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem byly použity stejné vzorky, jako v kapitole 2.6.1. Postup extrakce je popsán v kapitole 2.6.1.1, jen vnitřním standardem byl tokoferolacetát o koncentraci 45,8 $\mu\text{mol/l}$ a α -tokoferol z terčíku vzorku DBS byl eluován ethanolem obsahujícím 0,1% BHT a extrahován hexanem. K terčíku bylo přidáno 500 μl ethanolu obsahující 0,1% BHT a 10 μl IS. Po 30minutové inkubaci při laboratorní teplotě bylo k směsi přidáno 500 μl vody a 1,5 ml hexanu, obsah zkumavky třepán po dobu 5 minut a odstředěn (5 min, 2016 \times g). Organická vrstva byla přenesena do čisté zkumavky, hexan byl odpařen v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn v 50 μl ACN a směs přenesena do insertu vialky.

2.6.3 Účinky matrice

Pro potřebu testování účinků matrice bylo na odběrovou kartu nanášeno 15 μl krve od dvou různých dárců (6 vzorků DBS od každého dárce krve). Postup přípravy vzorku je popsán v kapitole 2.6.4., jen po spojení organických vrstev při extrakci bylo ke 3 vzorkům přidáno 10 μl standardu α -tokoferolu (asi 2,5 $\mu\text{mol/l}$) a ke 3 vzorkům 10 μl ethanolu (ty sloužily pro odečet pozadí). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn v 50 μl ACN. Dále byl v duplikátu připraven standard α -tokoferolu (2,5 $\mu\text{mol/l}$).

Eluční činidlo (500 μ l) bylo smícháno s 10 μ l standardu α -tokoferolu, organické rozpouštědlo odpařeno v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn v 50 μ l ACN.

2.6.4 Výtěžnost metody

Pro učení výtěžnosti metody byly vzorky DBS připraveny tak, že krev (190 μ l) byla smíchána s 10 μ l standardu α -tokoferolu o různé koncentraci nebo 10 μ l ethanolu (nulový přídavek, P_0). Na předem vyražený terčík odběrové karty ošetřený 0,1% BHT bylo nanášeno 10 μ l vzorku a ten byl ponechán schnout při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. K terčíku bylo přidáno 500 μ l elučního činidla a obsah zkumavky inkubován 30 minut při laboratorní teplotě, poté přidáno 500 μ l vody a 1,5 ml hexanu. Obsah zkumavky byl třepán po dobu 5 minut, odstředěn (5 min, 2016 \times g), organická vrstva přenesena do čisté zkumavky, ke zbytku bylo přidáno 1,5 ml hexanu a extrakce opakována. Organické rozpouštědlo bylo odpařeno v atmosféře dusíku a odparek rozpuštěn v 50 μ l ACN. Vzorky byly zpracovány v triplicátu.

2.6.5 Přesnost v sérii a mezi sériemi

Pro určení přesnosti metody bylo na odběrovou kartu ošetřenou 0,1% BHT nanášeno 30 μ l krve s různou koncentrací α -tokoferolu (0,5; 2,5; 10,0 μ mol/l). Od každé koncentrace bylo připraveno celkem 10 vzorků DBS. Vzorky DBS byly do doby analýzy uchovávány v uzavřeném plastovém sáčku při -20 $^{\circ}$ C po dobu ne delší než jeden měsíc. Od každé koncentrace bylo v jeden den analyzováno celkem 5 vzorků DBS (přesnost v sérii), zbylé vzorky DBS byly analyzovány v dalším dni (2 \times 5 vzorků od každé koncentrace; přesnost mezi sériemi). Postup extrakce byl stejný jako v kapitole 2.6.4.

2.6.6 Účinky hematokritu

Pro určení vlivu hematokritu na koncentraci α -tokoferolu ve vzorcích DBS byla krev odstředěna (10 min, 2016 \times g, 4 $^{\circ}$ C), plazma odebrána do čisté zkumavky a zbytek plazmy s leukocyty a trombocyty do odpadu. Plazma a ERY byly smíchány v různém poměru pro docílení hodnoty Htc 30, 40, 50 a 60 % (tabulka 2). Vliv Htc byl testován na 3 hladinách koncentrací tokoferolu (přídavek standardu o různé koncentraci k plné krvi s různou hodnotou Htc v poměru 19:1, v/v). Připravené vzorky krve (40 μ l) byly nanášeny na odběrovou kartu Whatman #903 ošetřenou 0,1% BHT, ponechány zaschnout při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a do doby analýzy skladovány v uzavřeném plastovém sáčku při -20 $^{\circ}$ C po dobu ne delší

než jeden měsíc. Vzorky DBS byly připraveny v triplikátu a zpracovány stejně, jak je uvedeno v kapitole 2.6.4.

Tabulka 2: Příprava vzorků suché kapky krve s různou hodnotou hematokritu

Hematokrit (%)	ERY (μl)	Plazma (μl)
30	300	700
40	400	600
50	500	500
60	600	400

2.6.7 Kalibrace

Kalibrační standardy vzorků DBS byly připraveny tak, jak je popsáno v kapitole 2.5. Postup zpracování vzorku DBS a extrakce α -tokoferolu byly dvojí.

2.6.7.1 Kalibrace s α -tokoferolem-D₆ jako vnitřním standardem

Terčík o průměru 6 mm byl umístěn do zkumavky, přidáno 10 μ l pracovního roztoku α -tokoferolu-D₆ (12 μ mol/l), 200 μ l hexanu a obsah zkumavky sonikován po dobu 20 min. Organická vrstva byla přenesena do čisté zkumavky, k terčíku přidáno 200 μ l hexanu a extrakce opakována. Organické rozpouštědlo bylo odpařeno v atmosféře dusíku, odparek rozpuštěn ve 100 μ l ACN a směs přenesena do insertu vloženého ve skleněné vialce.

2.6.7.2 Kalibrace s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem

Postup extrakce byl stejný jako v kapitole 2.6.4.

2.7 Příprava a zpracování vzorků suché kapky krve od dobrovolných dárců

Terčik o průměru 6 mm byl vložen do zkumavky, přidáno 500 μ l elučního činidla (s α -tokoferolacetátem jako IS) a obsah inkubován 30 min při laboratorní teplotě. K směsi bylo přidáno 500 μ l vody a 1,5 ml hexanu, obsah zkumavky třepán po dobu 5 minut, odstředěn (5 min, 2016 \times g), horní organická vrstva přenesena do čisté zkumavky a ke zbytku přidáno 1,5 ml hexanu pro opakovanou extrakci. Organické rozpouštědlo bylo odpařeno v atmosféře dusíku, odparek rozpuštěn v 50 μ l ACN a směs byla přenesena do insertu vloženého ve skleněné vialce.

2.8 Analytické parametry metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve

Linearita metody

Linearita je schopnost metody poskytovat výsledky testu, které jsou přímo úměrné koncentraci (množství) analytu ve vzorku v daném rozsahu. Matematicky řečeno, linearita je funkcí hodnot, které lze graficky znázornit jako přímkou. Je popisována jako interval mezi nejnižší a nejvyšší naměřenou koncentrací standardního roztoku, kde můžeme s určitou přesností a správností stanovit koncentraci analyzované látky.

Přesnost metody

Přesnost je definována jako míra shody mezi výsledky získanými opakovanou analýzou téhož vzorku za předem stanovených podmínek. Absolutní přesnosti nelze dosáhnout. Mírou nepřesnosti je tzv. směrodatná odchylka (*SD*). Její výpočet je uveden v rovnici 3, kde x_i je výsledek jednotlivého měření, *AVG* je aritmetický průměr a *n* je počet měření. Míra přesnosti je posuzována variačním koeficientem (*CV*), jehož výpočet je uveden v rovnici 4. Podle podmínek rozlišujeme přesnost v sérii (opakovatelnost), přesnost mezi sériemi (mezilehlá přesnost) a mezilaboratorní přesnost. Přesnost metody nemusí být stejná v celém rozsahu koncentrací, tedy nepřesnost lze určit na různých hladinách, nejlépe na takové, která je blízká rozhodovací hladině (např. horní referenční mez).

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

AVG, aritmetický průměr; x_i , naměřená koncentrace analytu ve vzorku; n , počet vzorků (měření) v sérii

Rovnice 3: Výpočet směrodatné odchylky

$$CV (\%) = \frac{SD}{AVG} * 100$$

SD, směrodatná odchylka; *AVG*, aritmetický průměr; *CV*, variační koeficient

Rovnice 4: Výpočet variačního koeficientu

Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (limita detekce, LOD, z angl. limit of detection) je definována jako nejnižší relevantní detekovatelné (danou metodou) množství analytu. LOD lze vypočítat různými způsoby, kdy samotná volba výpočtu vychází i z použité analytické metody. Pravidlem pro vyhodnocení LOD, je sjednocení výpočtu pro veškeré experimenty v daném souboru, kdy k výpočtu se použije ten vzorec, který nám poskytne nejnižší hodnotu LOD. V rámci separačních metod se LOD vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie.

Mez stanovitelnosti (limit kvantifikace, LOQ, z angl. limit of quantification) je definována jako nejnižší množství analytu, které je možné danou metodou nejen detekovat, ale i stanovit. Na rozdíl od LOD se LOQ počítá jako desetinásobek šumu základní linie.

2.9 Chromatografické podmínky

Hladina α -tokoferolu ve vzorcích DBS byla stanovena metodou RP-HPLC-MS, α -tokoferol byl separován na koloně Discovery[®] HS F5.

HPLC podmínky:

- Isokratická eluce
- Mobilní fáze: ACN/H₂O, 83:17 (v/v) + 0,1% HCOOH
- Průtok mobilní fáze: 0,2 ml/min

- Dávkovaný objem vzorku: 5 μ l
- Celková doba analýzy: 20 min
- Teplota autosampleru: 10 °C
- Teplota kolony: 40 °C

MS podmínky:

- ESI:
 - Teplota v iontovém zdroji: 300 °C
 - Teplota DL: 250 °C
 - Teplota vyhřívacího bloku: 400 °C
 - Průtok zmlžovacího plynu: 2 l/min
 - Průtok sušícího plynu: 10 l/min
 - Průtok vyhřívacího plynu: 10 l/min
 - Napětí kapiláry: 3 kV
- Disociační plyn: 230 kPa
- Loop time: 0,299 s
- Mód: pozitivní MRM, optimalizované MRM přechody jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Optimalizované podmínky pro hmotnostní spektrometr

Analyzovaná látka	Retenční čas (min)	Prekurzor (m/z)	Produkt (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
α-tokoferol	6,9	431,30	165,25	-15	-19	-18
α-tokoferol-D₆ (IS)	6,9	437,50	171,35	-15	-21	-13
α-tokoferolacetát	8,4	473,30	207,10	-20	-20	-20

CE, kolizní energie; Pre Bias, usměrňovací napětí na kvadrupólech

2.10 Zpracování výsledků

K vyhodnocení a zpracování naměřených dat byly použity programy MS Excel a LabSolutions.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

V dnešní době, kdy roste počet nejrůznějších civilizačních chorob, se pozornost celého světa obrací ke způsobu našeho životního stylu, zejména pak k výživě. Jednou z důležitých složek výživy tvoří mikroživiny rozpustné v tucích, mezi které můžeme zařadit například karotenoidy a vitamíny A a E. Jejich nadbytek nebo nedostatek je spojován s projevy určitých onemocnění. Nejvýznamnější úlohou vitamínu E, a to všech jeho isoform, je bezesporu jeho antioxidační aktivita, dále také aktivita protizánětlivá nebo protinádorová. α -Tokoferol se používá k prevenci a léčbě mnoha onemocnění, například rakoviny, onemocnění centrálního nervového systému nebo imunitního a kardiovaskulárního systému. Působí také preventivně proti rozvoji diabetu či aterosklerózy [38, 43, 47].

V důsledku toho se v posledních letech zvýšil počet analýz všech těchto mikroživin v biologických vzorcích. Simultánní analýza těchto vitamínů, nebo každého zvlášť, se provádějí zejména metodou HPLC s UV nebo FLD detekcí, anebo detekcí MS/MS. Před chromatografickou analýzou jsou tyto látky extrahovány z biologické matrice a používají se různé předúpravy vzorků, jako je LLE, SPE, nebo precipitace proteinů. Nejpoužívanější technikou odběru vzorků krve je odběr žilní nebo arteriální krve a v neposlední řadě také technika DBS. Ačkoli má technika DBS velký potenciál pro odběr krve s následnou analýzou mikroživin rozpustných v tucích, bylo zatím provedeno málo studií, ve kterých se tato technika používá. Do dnešní doby byly pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS publikovány především práce používající HPLC s UV detekcí. Všechny tyto publikované metody používaly při přípravě vzorků DBS LLE methanolem nebo hexanem. Jako vnitřní standard používaly α -tokoferolacetát a separace probíhala na kolonách s vázanou reverzní fází [164, 224, 225]. V literatuře je dostupná pouze jediná metoda pro stanovení karotenoidů, tokoferolů (α -T, γ -T a δ -T) a *all-trans*-retinolu ve vzorcích DBS LC-MS/MS [224]. Technika DBS se rutinně používá především v rámci novorozeneckého screeningu pro její rychlost a jednoduchost odběru vzorků a potenciálně by mohla sloužit také pro odběr vzorků k analýze α -tokoferolu [101].

Cílem této práce bylo vyvinout dostatečně citlivou, specifickou a rychlou metodu pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS, která by mohla mít uplatnění v klinické praxi v rámci prevence rozvoje civilizačních chorob, jakými jsou například rakovina, diabetes nebo ateroskleróza.

3.1 Optimalizace podmínek kapalinové chromatografie a hmotnostní detekce

3.1.1 Kapalinová chromatografie

Byla optimalizována řada chromatografických podmínek pro dosažení co nejvyšší citlivosti a robustnosti metody pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS. Chromatografická analýza α -tokoferolu byla provedena HPLC na reverzní fázi využívající isokratickou eluci. V rámci optimalizace byly testovány dvě kolony, Discovery[®] HS F5 (150 × 2,1 mm; 3 μ m), opatřena ochrannou kolonou Discovery[®] HS F5 (4 × 2,1 mm; 3 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a kolona Ascentis[®] Express C18 (150 × 4,6 mm, 5 μ m), opatřena ochrannou kolonou Ascentis[®] Express C18 (5 × 4,6 mm, 5 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) s konstantním vyhříváním na 40 °C. Kolona Discovery[®] HS F5 poskytla za daných podmínek lepší tvar píku a rychlejší separaci než kolona Ascentis[®] Express C18. Složení mobilní fáze bylo optimalizováno pro získání co největší intenzity píku a nejkratšího času analýzy, kdy byla testována celá řada gradientů a isokratických elucí. Nakonec jako optimální mobilní fáze s nejlepšími parametry byla zvolena směs ACN a deionizované vody v poměru 83:17 (v/v) s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,2 ml/min, dávkovaný objem vzorku byl 5 μ l a celkový čas analýzy 20 min. Chromatografický záznam standardu α -tokoferolu S₅ a vzorku od dobrovolného dárce je uveden v příloze 1 a 2.

3.1.2 Hmotnostní spektrometrie

K detekci α -tokoferolu byl použit hmotnostní spektrometr ESI a QqQ pracující v módu MRM. Pro dosažení co nejlepší odezvy detektoru byla optimalizována řada parametrů. Nejdříve se provedl SCAN standardů α -tokoferolu a vnitřních standardů v mobilní fázi, jak v pozitivním, tak i negativním módu. Při tomto měření byla zjištěna vyšší intenzita a menší poměr S/N v pozitivním módu ionizace pro všechny testované látky (α -tokoferol i oba IS). Dále byla provedena pro všechny analyty softwarem řízená optimalizace MRM přechodů, jednotlivých hodnot napětí pro fragmentaci a usměrňovacího napětí na kvadrupólech. Monitorované MRM přechody pro α -tokoferol byly 431,30 > 165,25 (kolizní energie 19 V), pro α -tokoferol-D₆ 437,30 > 171,35 (kolizní energie 21 V) a pro α -tokoferolacetát 437,30 > 207,10 (kolizní energie 20 V). Tyto přechody vykazovaly nejvyšší intenzitu a téměř žádné interference matrice. Souhrnná tabulka s optimalizovanými parametry, při kterých probíhalo měření je uvedena v kapitole 2.9.

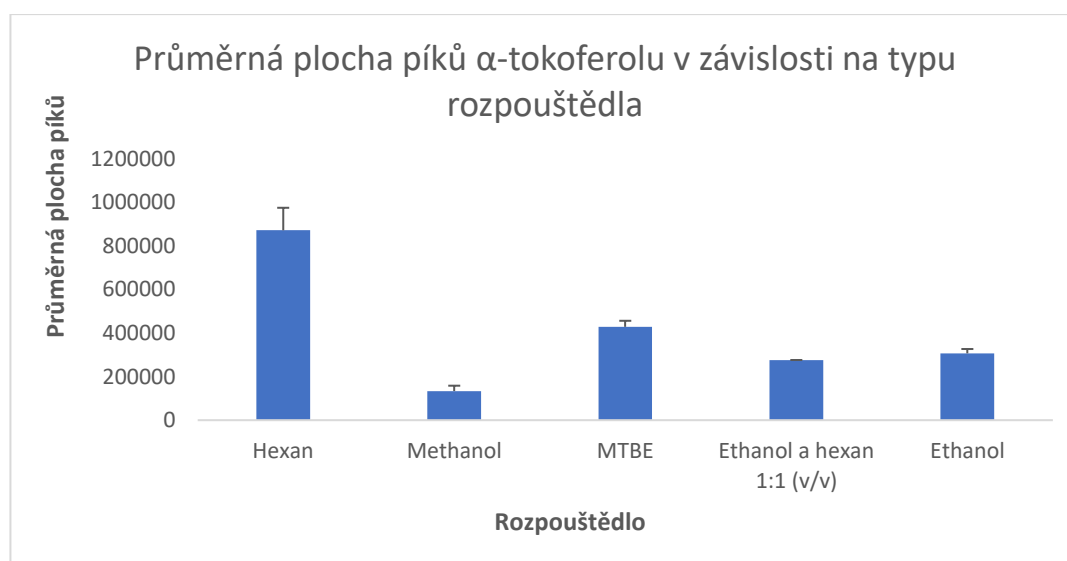
3.2 Volba extrakčního činidla s α -tokoferolem-D₆ jako vnitřním standardem

Pro extrakci α -tokoferolu ze vzorků DBS bylo testováno 5 možných extrakčních činidel, a to konkrétně methanol, hexan, MTBE, směs ethanolu a hexanu v poměru 1:1 (v/v) a ethanol. Postup zpracování vzorků je uveden v kapitole 2.6.1.1. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4 a grafu 1.

Tabulka 4: Volba vhodného extrakčního činidla

Průměr		
Extrakční činidlo	Plocha	Poměr ploch k IS
Methanol	133627 ± 24590	0,34 ± 0,11
Hexan	871205 ± 103329	0,39 ± 0,17
Methyl-<i>terc</i>-butylether	428219 ± 27837	0,17 ± 0,02
ethanol a hexan 1:1 (v/v)	276078 ± 0	0,21 ± 0
ethanol	306587 ± 20010	0,53 ± 0,03

pozn.: pro směs ethanol a hexan 1:1 (v/v) nebyly vzorky změřeny v duplikátu z důvodu ztráty při jejich přípravě



Graf 1: Závislost průměrné ± SD velikosti plochy píků α -tokoferolu na extrakčním činidle

MTBE, methyl-*terc*-butylether

Jak je z tabulky a grafu patrné, nejvyšší účinnosti extrakce bylo dosaženo s použitím hexanu jako extrakčního činidla. Hexan byl proto vybrán pro další optimalizaci a byl nadále používán.

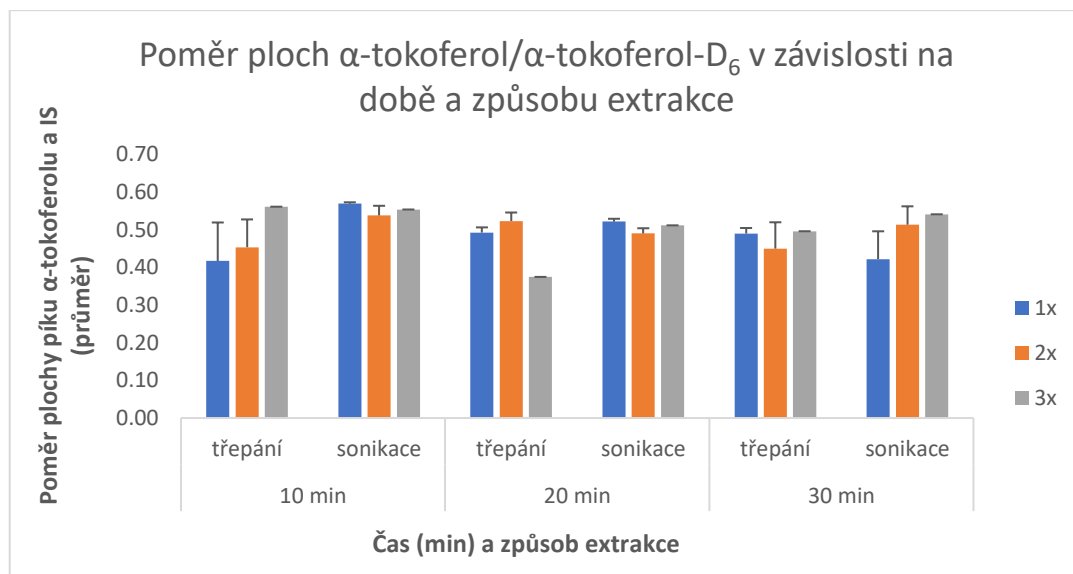
3.3 Test počtu extrakcí a účinnost třepání nebo sonikace po různou dobu při extrakci α -tokoferolu ze vzorku suché kapky krve s α -tokoferolem-D₆ jako vnitřním standardem

Pro co nejúčinnější extrakci α -tokoferolu ze vzorku DBS byly testovány různé počty extrakcí (1, 2 nebo 3) a třepání nebo sonikace při extrakci po různě dlouhou dobu (konkrétně 10, 20 nebo 30 min). Postup zpracování vzorků je uveden v kapitole 2.6.1.2. a 2.6.1.3. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5 a grafech 2 a 3.

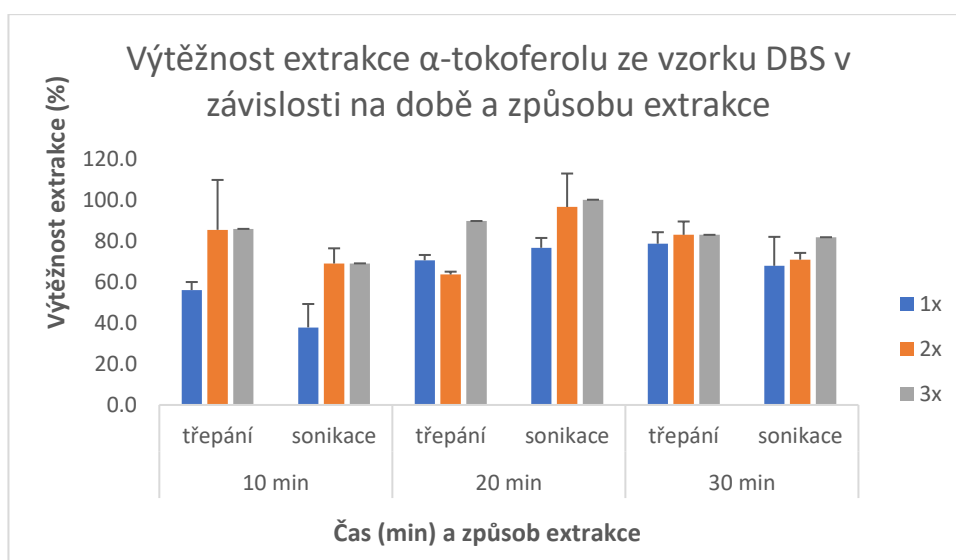
Tabulka 5: Výsledky testu počtu extrakcí a účinnost třepání a sonikace při extrakci

Průměr ploch píků						
10 min		20 min		30 min		
	Třepání	Sonikace	Třepání	Sonikace	Třepání	Sonikace
	Plocha	Plocha	Plocha	Plocha	Plocha	Plocha
1	168625	113788 ±	212265 ±	230600 ±	236607 ±	204196 ±
extrakce	±11662	34296	7767	14306	16876	42434
2	257003	207555 ±	191374 ±	290492 ±	249630 ±	213173 ±
extrakce	±73196	22384	4173	49030	19589	9790
3	258362 ±	207746 ±	269922 ±	301128 ±	249630 ±	246101 ±
extrakce	0	0	0	0	0	0

Pozn.: vzorky pro 3 extrakce nebyly změřeny v duplikátu z důvodu ztráty při jejich přípravě



Graf 2: Závislost průměru \pm SD poměru plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 na počtu extrakcí a účinnosti třepání nebo sonikace



Graf 3: Výtěžnost extrakce v závislosti na čase a způsobu extrakce

Jak je vidět z porovnání plochy α -tokoferolu, účinnost extrakce byla nejvyšší při sonikaci po dobu 20 min a při dvojnásobné extrakci. Ještě k většímu nárůstu došlo při trojnásobné extrakci, nicméně oproti dvojnásobné extrakci byl zaznamenán nárůst účinnosti extrakce jen o 3,5 %. Rozdíl tedy nebyl tak veliký a z hlediska co největšího zkrácení času přípravy vzorku a analýzy se jevila dvojnásobná extrakce se sonikací po dobu 20 min jako nejvhodnější, a proto byla v dalším postupu používána.

Výsledky optimalizace extrakce s α -tokoferolem- D_6 jako IS se ukázaly jako nehodnotitelné a nevyhovující vzhledem k významným účinkům matrice a vzájemnému

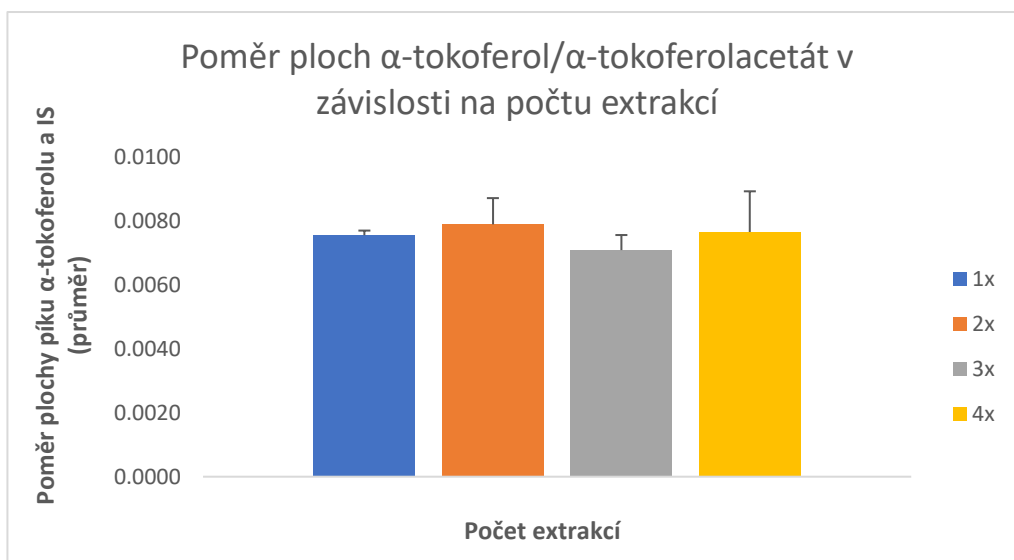
ovlivňování IS a α -tokoferolu (problém je více popsán v níže uvedené kapitole 3.9.1). Proto se od tohoto postupu ustoupilo a v rámci další optimalizace se prováděla nejprve eluce ethanolem a následně extrakce hexanem. Jako IS byl nově zvolen α -tokoferolacetát.

3.4 Test počtu extrakcí α -tokoferolu ze vzorku suché kapky krve s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem

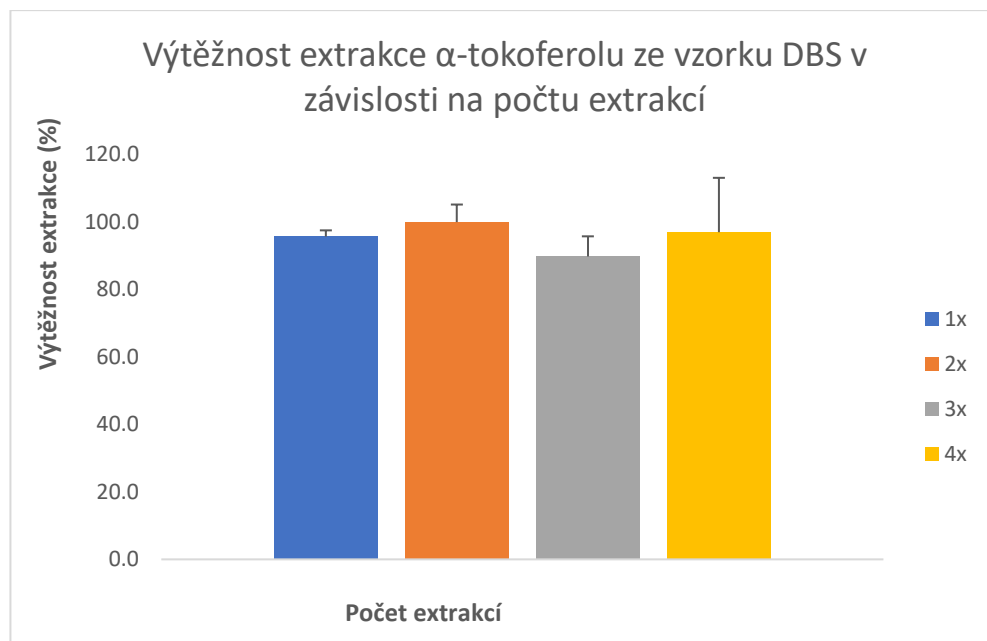
V rámci optimalizace extrakce byl testován počet extrakcí (1, 2, 3, nebo 4). Postup zpracování vzorků je uveden v kapitole 2.6.2.1. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a grafech 4 a 5.

Tabulka 6: Výsledky testu počtu extrakcí

	Plocha	Poměr ploch α -tokoferol/IS	Výtěžnost extrakce (%)
1 extrakce	394660 \pm 46568	0,0075 \pm 0,000146	95,7 \pm 2
2 extrakce	352369 \pm 50662	0,0078 \pm 0,000822	100,0 \pm 5
3 extrakce	246089 \pm 34533	0,0071 \pm 0,000471	89,8 \pm 6
4 extrakce	318304 \pm 121093	0,0076 \pm 0,001271	97,0 \pm 16



Graf 4: Závislost poměru plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolacetátu na počtu extrakcí



Graf 5: Výtěžnost extrakce v závislosti na počtu extrakcí

Jak je patrné z grafického vyhodnocení, nejvyšší účinnosti extrakce bylo dosaženo při dvojnásobné extrakci hexanem.

3.5 Účinky matrice

Jediná publikace zabývající se optimalizací metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS LC-MS/MS uvádí účinky matrice u sledovaných sloučenin nižší než 17 % [224]. Pro testování účinků matrice byly připraveny a extrahovány vzorky v triplicátu bez a s přidavkem standardu α -tokoferolu. Plocha píku α -tokoferolu vzorku bez přidavku standardu α -tokoferolu byla odečtena od plochy píku α -tokoferolu vzorku s přidavkem standardu α -tokoferolu a podělena plochou píku standardu α -tokoferolu v mobilní fázi. Příprava vzorků je uvedena v kapitole 2.6.3. Zjištěné účinky matrice byly velké, konkrétně 141,6 a 138,7 %.

3.6 Výtěžnost metody

Jediná publikace zabývající se optimalizací metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS LC-MS/MS uvádí výtěžnost stanovovaných analytů vyšší než 72 % [224]. Příprava vzorků pro určení výtěžnosti je uvedena v kapitole 2.6.4. Hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé přidavky standardu α -tokoferolu jsou uvedeny v tabulce 7. Výtěžnost metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS LC-MS/MS byla ovlivněna významnými účinky matrice.

Tabulka 7: Výtěžnost metody pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapce krve

Standard	Koncentrace α -T teoretická ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace α -T naměřená ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)
P ₀	-	7,25	-
P ₁	0,52	1,22±1,28	232,8
P ₃	2,55	1,70±0,30	66,9
P ₅	10,48	11,07±1,15	105,6
Průměr (%)			135,1
CV (%)			52,5

CV, variační koeficient

3.7 Přesnost metody v sérii a mezi sériemi

Byly zvoleny 3 různé hladiny α -tokoferolu ve vzorcích DBS v rozsahu kalibrační křivky (nízká, střední a vysoká), od každého vzorku DBS bylo připraveno 5 replikátů. Příprava vzorků DBS je popsána v kapitole 2.6.5. Výsledky přesnosti pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS jsou uvedeny v tabulce 8. Hodnoty SD a CV byly vypočítány dle rovnic 3 a 4.

Tabulka 8: Přesnost metody pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve

Koncentrace α -tokoferolu ($\mu\text{mol/l}$)									
Den	AVG			SD			CV (%)		
	L	M	H	L	M	H	L	M	H
1	5,16	7,55	18,04	0,76	0,20	0,87	14,7	2,6	4,8
2	3,05	6,92	8,13	0,30	0,11	0,15	9,8	1,6	1,8
Průměr	4,10	7,24	13,09	0,53	0,15	0,51	12,2	2,1	3,3

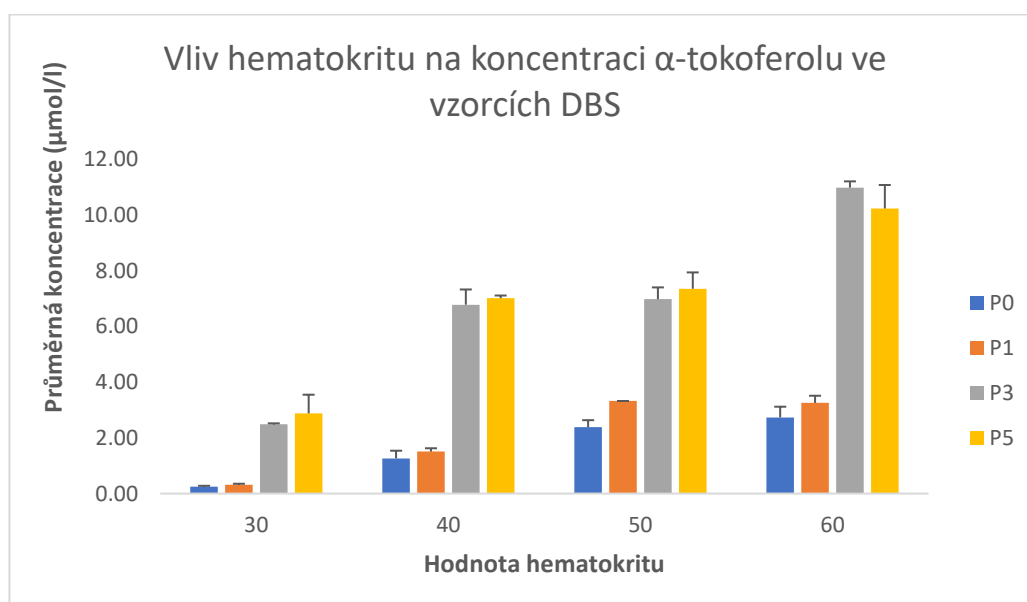
L, vzorek krve s nízkou koncentrací α -tokoferolu; M, vzorek krve se střední koncentrací α -tokoferolu; H, vzorek krve s vysokou koncentrací α -tokoferolu; AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

3.8 Účinky hematokritu

Byl testován vliv Htc na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku DBS. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 2.6.6. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 9 a grafu 6. Z výsledků je patrné, že u všech vzorků DBS roste se zvyšující se hodnotou Htc koncentrace α -tokoferolu.

Tabulka 9: Vliv hematokritu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

Htc (%)	Koncentrace α -tokoferolu ($\mu\text{mol/l}$)							
	Bez přídatku		Přídavek 0,5 $\mu\text{mol/l}$		Přídavek 2,5 $\mu\text{mol/l}$		Přídavek 10,0 $\mu\text{mol/l}$	
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD
30	0,25	0,03	0,32	0,03	2,48	0,04	2,88	0,67
40	1,26	0,28	1,51	0,12	6,77	0,55	7,01	0,10
50	2,38	0,25	3,32	0,00	6,97	0,42	7,34	0,59
60	2,73	0,38	3,25	0,26	10,97	0,23	10,22	0,84



Graf 6: Vliv hematokritu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

3.9 Linearita metody

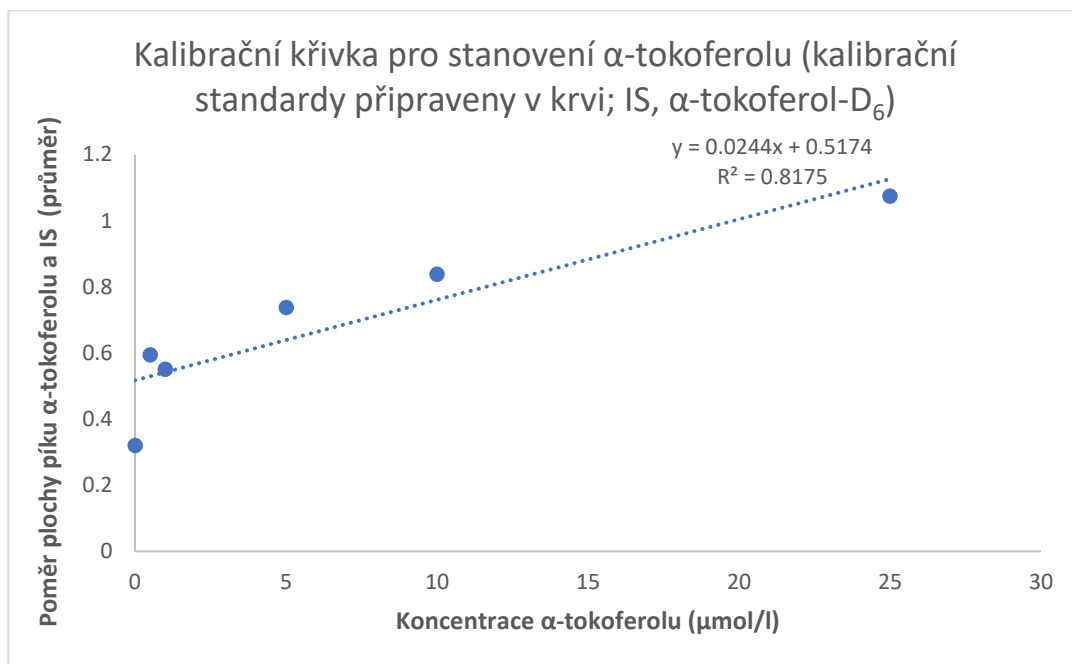
Pro určení linearity metody byla použita metoda kalibrační křivky. Postup přípravy sedmibodové kalibrační křivky pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS je uveden v kapitole 2.5. V jediné publikaci zabývající se optimalizací metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS LC-MS/MS je uvedena mez detekce 10 nmol/l [224].

3.9.1 Kalibrační křivka s α -tokoferolem-D₆ jako vnitřním standardem

Příprava kalibračních standardů v krvi používající α -tokoferol-D₆ jako vnitřní standard je popsána v kapitole 2.6.7.1. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10 a grafu 7. Po zjištění vlivu zvyšující se koncentrace α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku DBS na odezvu IS byla připravena kalibrační řada standardů se stejnými koncentracemi v ethanolu. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v tabulce 11 a v grafu 8.

Tabulka 10: Plochy α -tokoferolu a α -tokoferolu-D₆ kalibračních standardů připravených v krvi

Kalibrace v krvi				
	Koncentrace α -tokoferolu (μ mol/l)	Plocha píku IS	Plocha píku α -tokoferolu	Poměr ploch píků α -tokoferol/IS
S ₀	0,0	116 699	364 138	0,320
S ₁	0,5	186 849	314 523	0,594
S ₂	1,0	226 974	412 298	0,551
S ₃	2,5	554 305	652 419	0,850
S ₄	5,0	512 436	694 399	0,738
S ₅	10,0	723 692	863 324	0,838
S ₆	25,0	841 051	783 047	1,074

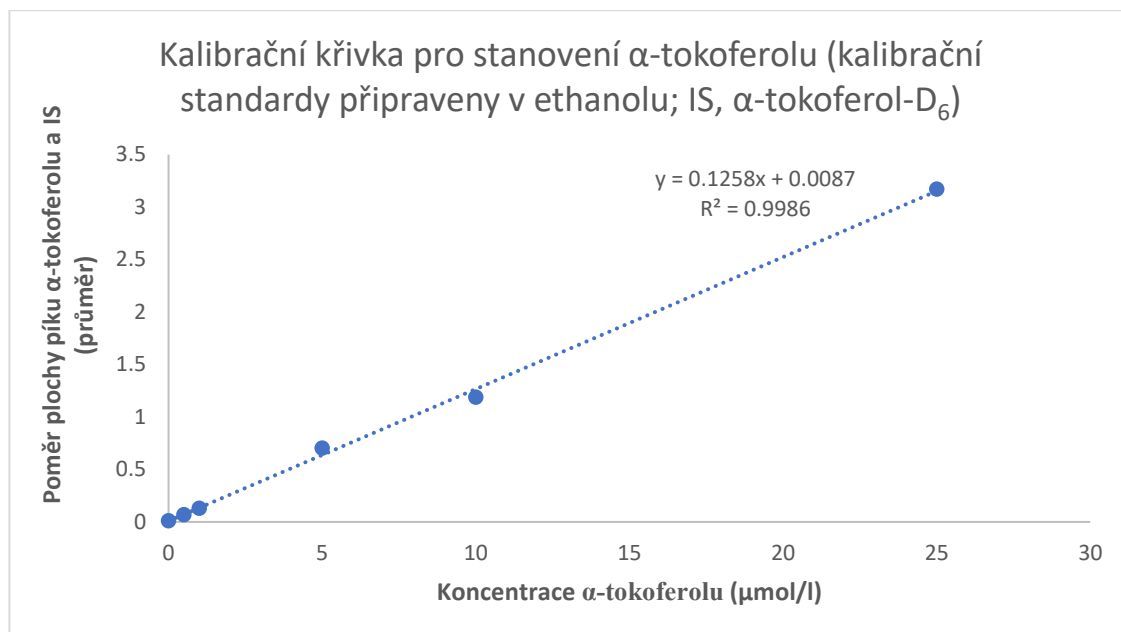


Graf 7: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve se standardy připravenými v krvi

Závislost poměru průměrných ploch píku α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 kalibračních standardů α -tokoferolu připravených v krvi na koncentraci α -tokoferolu

Tabulka 11: Plochy α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 kalibračních standardů připravených v ethanolu

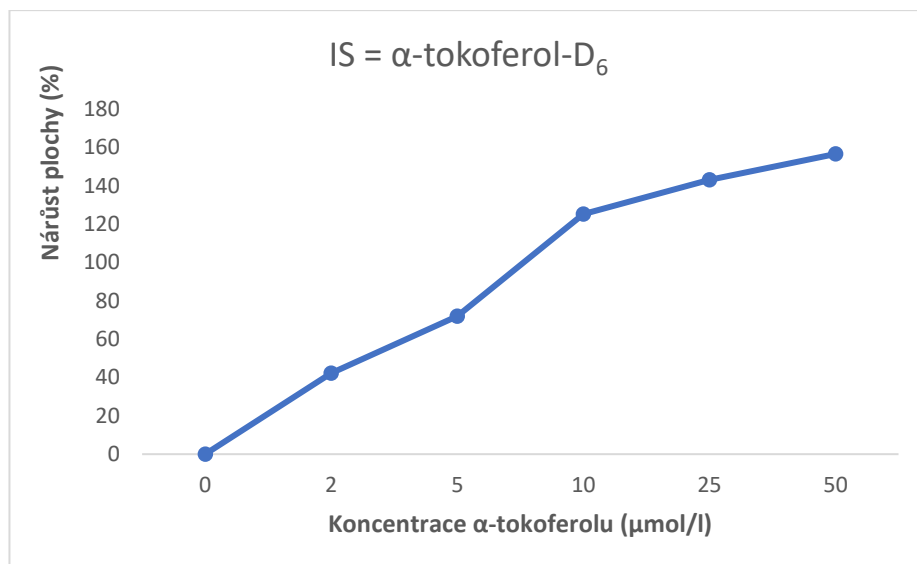
Kalibrace v ethanolu				
	Koncentrace α-tokoferolu ($\mu\text{mol/l}$)	Plocha píku IS	Plocha píku α-tokoferolu	Poměr ploch píků α-tokoferol/IS
S₀	0,0	985 842	11 020	0,011
S₁	0,5	821 071	56 126	0,068
S₂	1,0	1 166 642	150 040	0,129
S₃	2,5	1 977 122	2 139 479	1,082
S₄	5,0	1 157 615	813 962	0,703
S₅	10,0	1 608 161	1 912 340	1,189
S₆	25,0	2 574 417	8 162 772	3,171



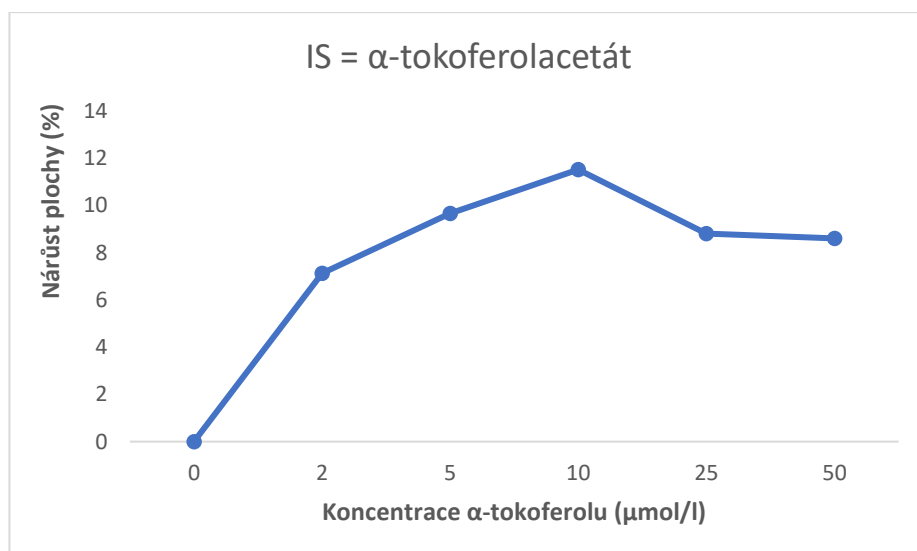
Graf 8: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve se standardy připravenými v ethanolu

Závislost poměru průměrných ploch píku α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 kalibračních standardů α -tokoferolu připravených v ethanolu na koncentraci α -tokoferolu

Jak je z výsledků patrné, kalibrační křivka α -tokoferolu, kdy kalibrační standardy α -tokoferolu byly připraveny v ethanolu, vykazovala mnohem lepší parametry (hodnota $R^2 = 0,99$) oproti kalibrační křivce, kdy kalibrační standardy α -tokoferolu byly připraveny v krvi ($R^2 = 0,82$). Bylo zjištěno, že α -tokoferol extrahovaný ze vzorku DBS se v iontovém zdroji navzájem ovlivňuje s vnitřním standardem α -tokoferolem- D_6 . Toto tvrzení bylo podpořeno kalibračními křivkami, kdy kalibrační standardy α -tokoferolu byly připraveny v ethanolu s přidáním vnitřního standardu α -tokoferolu- D_6 nebo α -tokoferolacetátu (grafy 9 a 10). Z tohoto důvodu byl pro další optimalizaci metody a pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS dobrovolných dárců krve zvolen jako vnitřní standard α -tokoferolacetát, který se neovlivňuje s α -tokoferolem.



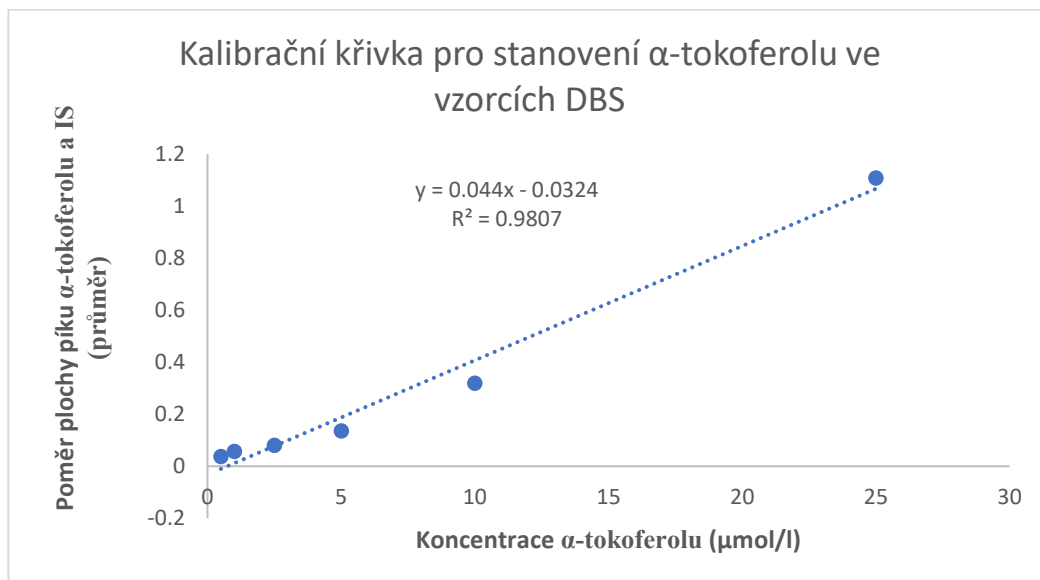
Graf 9: Závislost nárůstu plochy IS α -tokoferolu-D₆ na koncentraci α -tokoferolu v ethanolu



Graf 10: Závislost nárůstu plochy IS α -tokoferolacetátu na koncentraci α -tokoferolu v ethanolu

3.9.2 Kalibrační křivka s α -tokoferolacetátem jako vnitřním standardem

Příprava kalibračních standardů α -tokoferolu v krvi, kdy byl jako IS přidán α -tokoferolacetát, je popsána v kapitole 2.6.7.2. Výsledky jsou uvedeny v grafu 11.



Graf 11: Kalibrační křivka pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve

Závislost poměru průměrných ploch píku α -tokoferolu a α -tokoferolacetátu kalibračních standardů α -tokoferolu připravených v krvi na koncentraci α -tokoferolu

Z grafu je patrné, že závislost poměru průměrné plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolacetátu na koncentraci α -tokoferolu ve standardu je lineární v celém testovaném rozsahu 0,5-25,0 $\mu\text{mol/l}$.

Mez detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) byly určeny z 5 kalibračních křivek. Jejich výpočet je uveden v rovnicích 5 a 6, kde S_a je směrodatná odchylka úseku kalibračních křivek (intercept) a b je průměrná směrnicí kalibračních křivek. Parametry kalibračních křivek jsou uvedeny v tabulce 12.

$$LOD = \frac{3,3 \times S_a}{b}$$

Rovnice 5: Výpočet meze detekce (LOD) z kalibračních křivek

$$LOQ = \frac{10 \times S_a}{b}$$

Rovnice 6: Výpočet meze stanovitelnosti (LOQ) z kalibračních křivek

Tabulka 12: Parametry kalibračních křivek pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve

Analyt	k (AVG)	q (AVG)	q (SD)	R ²	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
α-Tokoferol	0,06352	-0,04998	0,068554	0,9876	3,56	10,79

k, směrnice; q, úsek na ose y (intercept); AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; R²= hodnota spolehlivosti; LOD, mez detekce; LOQ, mez stanovitelnosti

Z důvodu významných účinků matrice byla připravena kalibrační řada standardů α -tokoferolu o stejné koncentraci v čistém rozpouštědle (ethanol), která byla změřena 10x a použita pro výpočet hodnot LOD a LOQ. Hodnoty LOD a LOQ vypočtené z těchto kalibračních křivek byly pro LOD 0,19 $\mu\text{mol/l}$ a pro LOQ 0,59 $\mu\text{mol/l}$, což jsou hodnoty porovnatelné s dostupnou literaturou.

3.10 Stanovení hladin α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve dobrovolných dárců

Vzorky DBS byly od dobrovolných dárců získány postupem uvedeným v kapitole 2.4 a zpracovány postupem popsáním v kapitole 2.7. Hladiny α -tokoferolu byly odečteny z kalibrační křivky, jako IS byl použit α -tokoferolacetát. Získané výsledky jsou uvedeny v příloze 3. Hladiny α -tokoferolu v krvi určené ze vzorků získaných technikou DBS od dobrovolných dárců jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Hladiny α -tokoferolu v krvi určené ze vzorků získaných technikou suché kapky krve od dobrovolných dárců

	Medián ($\mu\text{mol/l}$)	IQR ($\mu\text{mol/l}$)	Minimum ($\mu\text{mol/l}$)	Maximum ($\mu\text{mol/l}$)
Ženy	1,23	0,22	0,95	1,67
Muži	1,15	0,23	1,04	1,87
Všichni	1,20	0,22	0,95	1,87

IQR, mezikvartilové rozpětí (rozdíl mezi 75. a 25. kvartilem)

Hladiny α -tokoferolu ve vzorcích DBS byly v rozmezí $1,20 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$. Ve studii zabývající se stanovením α -tokoferolu ve vzorcích DBS metodou LC-MS/MS uvádějí autoři u dobrovolných dárců hladiny $8,34 \pm 3,08 \mu\text{M}$ [224].

ZÁVĚR

Cílem práce bylo optimalizovat přípravu vzorku DBS a validovat metodu LC-MS/MS pro stanovení α -tokoferolu v krvi získané technikou DBS. Byla vyvinuta, optimalizována a ověřena dostatečně citlivá a rychlá metoda pro stanovení α -tokoferolu LC-MS/MS ve vzorcích krve získaných technikou DBS. Metoda by mohla být potenciálně využita pro monitorování hladiny α -tokoferolu v krvi za účelem prevence vzniku a rozvoje některých onemocnění spojených převážně s oxidačním stresem. Hlavní předností techniky DBS je neinvazivní odběr vzorku krve, skladování a transport vzorku DBS. Byly optimalizovány podmínky LC-MS/MS a zpracování vzorku DBS před vlastní analýzou. Výsledky optimalizace extrakce s IS α -tokoferolem- D_6 byly nepřijatelné a nevyhovující vzhledem k významným účinkům matrice a vzájemnému ovlivňování IS a α -tokoferolu. Bylo zjištěno, že α -tokoferol extrahovaný ze vzorku DBS se v iontovém zdroji navzájem ovlivňuje s α -tokoferolem- D_6 . Proto pro další optimalizaci metody byl jako IS použit α -tokoferolacetát. Při vývoji metody byla optimalizována řada parametrů, jakými jsou výtěžnost, přesnost a linearita metody. Metoda byla ověřena stanovením hladin α -tokoferolu ve vzorcích DBS 30 dobrovolných dárců krve (16 žen a 14 mužů). Vzhledem k nejednoznačným výsledkům optimalizace i naměřeným hladinám α -tokoferolu v krvi dobrovolných dárců, významným účinkům matrice a nedostatečné výtěžnosti α -tokoferolu ze vzorku DBS, bude nutná další optimalizace metody přípravy vzorků před analýzou, ale i vyřešení účinků matrice na ionizaci α -tokoferolu. Řešením by mohla být například extrakce technikou SPE, či změna podmínek chromatografie.

SEZNAM ZDROJŮ

- [1] BIRINGER, Marc, Karsten SIEMS, Alexander MAXONES, Jan FRANK a Stefan LORKOWSKI. Natural 6-hydroxy-chromanols and -chromenols: structural diversity, biosynthetic pathways and health implications. *RSC Advances* [online]. 2018, **8**(9), 4803-4841 [cit. 2022-01-07]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C7RA11819H.
- [2] Food and Agriculture Organization; World Health Organization. Vitamin and Mineral Requirements in Human Nutrition, 2nd ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 1998; pp. 1–20.
- [3] YOSHIDA, Yasukazu, Etsuo NIKI a Noriko NOGUCHI. Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 2003, **123**(1), 63-75 [cit. 2022-01-07]. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-3084(02)00164-0.
- [4] MURRAY, Robert K., et al. Harperova biochemie. Z angl. 23. vyd. přel. Lenka Fialová et. al. 4. vyd. v ČR. Praha: H & H, 2002. ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- [5] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 14985, Vitamin E; [cited 2022 Jan. 3]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-E>.
- [6] SCHWENKE, Dawn C. Does lack of tocopherols and tocotrienols put women at increased risk of breast cancer? *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2002, **13**(1), 2-20 [cit. 2022-01-07]. ISSN 09552863. Dostupné z: doi:10.1016/S0955-2863(01)00207-8.
- [7] ATKINSON, J., D. MANOR a R. PARKER. Vitamin E. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, 2013, 545-550 [cit. 2022-01-07]. ISBN 9780123786319. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378630-2.00223-1.
- [8] BRUNO, R.S. a E. MAH. Vitamin E. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Elsevier, 2014 [cit. 2022-01-07]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00231-2.
- [9] REITER, Elke, Qing JIANG a Stephan CHRISTEN. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2007, **28**(5-6), 668-691 [cit. 2022-01-07]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2007.01.003.
- [10] KRAUSS, Stephanie, Vanessa DARWISCH a Walter VETTER. Occurrence of tocopheryl fatty acid esters in vegetables and their non-digestibility by artificial digestion juices. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1) [cit. 2022-01-07]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-25997-2.
- [11] MIYAZAWA, Taiki, Gregor C. BURDEOS, Mayuko ITAYA, Kiyotaka NAKAGAWA a Teruo MIYAZAWA. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB*

- Life* [online]. 2019, **71**(4), 430-441 [cit. 2022-01-07]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.2008.
- [12] SZEWCZYK, Kacper, Aleksandra CHOJNACKA a Magdalena GÓRNICKA. Tocopherols and Tocotrienols—Bioactive Dietary Compounds; What Is Certain, What Is Doubt? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(12) [cit. 2022-01-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22126222.
- [13] KUCHAN, Matthew J, Christopher J MOULTON, Roger A DYER, Soren K JENSEN, Karen J SCHIMPF a Sheila M INNIS. RRR- α -Tocopherol Is the Predominant Stereoisomer of α -Tocopherol in Human Milk. *Current Developments in Nutrition* [online]. 2018, **2**(8) [cit. 2022-01-07]. ISSN 2475-2991. Dostupné z: doi:10.1093/cdn/nzy055.
- [14] RÉBLOVÁ, Zuzana a P. OKROUHLÁ. Ability of phenolic acids to protect α -tocopherol. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. 2018, February 2018, **28**(No.4), 290-297 [cit. 2022-01-07]. Dostupné z: doi:10.17221/114/2010-CJFS.
- [15] TRABER, M G, R J SOKOL, G W BURTON, K U INGOLD, A M PAPAS, J E HUFFAKER a H J KAYDEN. Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate alpha-tocopherol into lipoproteins secreted by the liver. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1990, **85**(2), 397-407 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI114452.
- [16] PERSSON, Christina, Shizuka SASAZUKI, Manami INOUE, Norie KURAHASHI, Motoki IWASAKI, Tsutomu MIURA, Weimin YE a Shoichiro TSUGANE. Plasma levels of carotenoids, retinol and tocopherol and the risk of gastric cancer in Japan: a nested case–control study. *Carcinogenesis* [online]. 2008, **29**(5), 1042-1048 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/bgn072.
- [17] Nordic Nutrition Recommendations. Integrating Nutrition and Physical Activity, 5th ed.; *Nordic Council of Ministers*: Copenhagen, Denmark, 2014.
- [18] Jarosz, M.; Rychlik, E.; Stoś, K.; Charzewska, J. Dietary References for Polish Population and Their Application; *Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny*: Warsaw, Poland, 2020.
- [19] Deutschland-Austria-Confoederatio Helvetica. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung*, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr; 2. Auflage/1. Ausgabe; DGE: Bonn, Germany, 2015.
- [20] RAEDERSTORFF, Daniel, Adrian WYSS, Philip C. CALDER, Peter WEBER a Manfred EGGERSDORFER. Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition* [online]. 2015, **114**(8), 1113-1122 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0007-1145. Dostupné z: doi:10.1017/S000711451500272X.
- [21] Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as α -tocopherol. *EFSA Journal* [online]. 2015, **13**(7) [cit. 2022-01-07]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2015.4149.

- [22] SCHMÖLZ, Lisa. Complexity of vitamin E metabolism. *World Journal of Biological Chemistry* [online]. 2016, **7**(1) [cit. 2022-01-07]. ISSN 1949-8454. Dostupné z: doi:10.4331/wjbc.v7.i1.14.
- [23] AZZI, Angelo a Achim STOCKER. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research* [online]. 2000, **39**(3), 231-255 [cit. 2022-01-07]. ISSN 01637827. Dostupné z: doi:10.1016/S0163-7827(00)00006-0.
- [24] HOSOMI, Akihiro, Makoto ARITA, Yuji SATO, Chikako KIYOSE, Tadahiko UEDA, Osamu IGARASHI, Hiroyuki ARAI a Keizo INOUE. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters* [online]. 1997, **409**(1), 105-108 [cit. 2022-01-07]. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(97)00499-7.
- [25] LEE, Paris a Lynn M. ULATOWSKI. Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life* [online]. 2019, **71**(4), 424-429 [cit. 2022-01-07]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1993.
- [26] TRABER, Maret G, Scott W LEONARD, Daniel L TRABER, et al. A-Tocopherol adipose tissue stores are depleted after burn injury in pediatric patients. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2010, **92**(6), 1378-1384 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.2010.30017.
- [27] YAMANASHI, Yoshihide, Tappei TAKADA, Ryoya KURAUCHI, Yusuke TANAKA, Toko KOMINE a Hiroshi SUZUKI. Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* [online]. 2017, **24**(4), 347-359 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1340-3478. Dostupné z: doi:10.5551/jat.RV16007.
- [28] SHEN, Wen-Jun, Salman AZHAR a Fredric B. KRAEMER. SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annual Review of Physiology* [online]. 2018, **80**(1), 95-116 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0066-4278. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-021317-121550.
- [29] BOREL, Patrick a Charles DESMARCHELIER. Genetic Variations Involved in Vitamin E Status. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(12) [cit. 2022-01-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17122094.
- [30] SCHNEIDER, Claus. Chemistry and biology of vitamin E [online]. 2005, **49**(1), 7-30 [cit. 2022-01-07]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.200400049.
- [31] CLIFFORD, Andrew J, Fabiana F DE MOURA, Charlene C HO, Jennifer C CHUANG, Jennifer FOLLETT, James G FADEL a Janet A NOVOTNY. A feasibility study quantifying in vivo human α -tocopherol metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2006, **84**(6), 1430-1441 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/84.6.1430.
- [32] YANG, Chung S., Philip LUO, Zishuo ZENG, Hong WANG, Mokenge MALAFA a Nanjoo SUH. Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of

- tocopherols and tocotrienols. *Molecular Carcinogenesis* [online]. 2020, **59**(4), 365-389 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0899-1987. Dostupné z: doi:10.1002/mc.23160.
- [33] DUTTON, Philip J., David O. FOSTER, Graham W. BURTON a Keith U. INGOLD. Simon metabolites of α -tocopherol are not formed via a rate-controlling scission of the 3'C-H bond. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1990, **9**(5), 435-439 [cit. 2022-01-07]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/0891-5849(90)90021-A.
- [34] BIRNINGER, Marc, Dagmar DROGAN a Regina BRIGELIUS-FLOHE. Tocopherols are metabolized in HepG2 cells by side chain ω -oxidation and consecutive β -oxidation. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2001, **31**(2), 226-232 [cit. 2022-01-07]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(01)00574-3.
- [35] IKEDA, Saiko, Kazumi TOYOSHIMA a Kanae YAMASHITA. Dietary Sesame Seeds Elevate α - and γ -Tocotrienol Concentrations in Skin and Adipose Tissue of Rats Fed the Tocotrienol-Rich Fraction Extracted from Palm Oil. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001, **131**(11), 2892-2897 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/131.11.2892.
- [36] TRABER, Maret G. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *Journal of Lipid Research* [online]. 2013, **54**(9), 2295-2306 [cit. 2022-01-07]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R032946.
- [37] KONO, Nozomu a Hiroyuki ARAI. Intracellular Transport of Fat-Soluble Vitamins A and E. *Traffic* [online]. 2015, **16**(1), 19-34 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1398-9219. Dostupné z: doi:10.1111/tra.12231.
- [38] BIRNINGER, Marc a Stefan LORKOWSKI. Vitamin E: Regulatory role of metabolites. *IUBMB Life* [online]. 2019, **71**(4), 479-486 [cit. 2022-01-07]. ISSN 15216543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1988.
- [39] JIANG, Qing. Natural forms of vitamin E and metabolites—regulation of cancer cell death and underlying mechanisms. *IUBMB Life* [online]. 2018 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1521-6543. Dostupné z: doi:10.1002/iub.1978.
- [40] UCHIDA, Tomono, Chisato ABE, Saki NOMURA, Tomio ICHIKAWA a Saiko IKEDA. Tissue Distribution of α - and γ -Tocotrienol and γ -Tocopherol in Rats and Interference with Their Accumulation by α -Tocopherol. *Lipids* [online]. 2012, **47**(2), 129-139 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/s11745-011-3620-7.
- [41] TRABER, M G a H J KAYDEN. Tocopherol distribution and intracellular localization in human adipose tissue. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1987, **46**(3), 488-495 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/46.3.488.
- [42] BURTON, G W, M G TRABER, R V ACUFF, D N WALTERS, H KAYDEN, L HUGHES a K U INGOLD. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *The*

- American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1998, **67**(4), 669-684 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/67.4.669.
- [43] SCHUBERT, Martin, Stefan KLUGE, Lisa SCHMÖLZ, Maria WALLERT, Francesco GALLI, Marc BIRRINGER a Stefan LORKOWSKI. Long-Chain Metabolites of Vitamin E: Metabolic Activation as a General Concept for Lipid-Soluble Vitamins? *Antioxidants* [online]. 2018, **7**(1) [cit. 2022-01-07]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox7010010.
- [44] REBOUL, Emmanuelle. Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants* [online]. 2017, **6**(4) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox6040095.
- [45] MOHD MUTALIP, Siti, Sharaniza AB-RAHIM a Mohd RAJIKIN. Vitamin E as an Antioxidant in Female Reproductive Health. *Antioxidants* [online]. 2018, **7**(2) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox7020022.
- [46] DAS GUPTA, Soumyasri a Nanjoo SUH. *Tocopherols in cancer: An update* [online]. 2016, **60**(6), 1354-1363 [cit. 2022-01-08]. ISSN 16134125. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201500847.
- [47] RANARD, Katherine M a John W ERDMAN. Effects of dietary RRR α -tocopherol vs all-racemic α -tocopherol on health outcomes. *Nutrition Reviews* [online]. 2018, **76**(3), 141-153 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: doi:10.1093/nutrit/nux067.
- [48] JIANG, Q., X. YIN, M. A. LILL, M. L. DANIELSON, H. FREISER a J. HUANG. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(51), 20464-20469 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0810962106.
- [49] JIANG, Qing a Bruce N. AMES. γ -Tocopherol, but not α -tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *The FASEB Journal* [online]. 2003, **17**(8), 816-822 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.02-0877com.
- [50] AZZI, Angelo. Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2018, **61**, 92-103 [cit. 2022-01-08]. ISSN 00982997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2017.06.004.
- [51] ZINGG, Jean-Marc a Angelo AZZI. Non-Antioxidant Activities of Vitamin E. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2004, **11**(9), 1113-1133 [cit. 2022-01-08]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/0929867043365332.
- [52] AZZI, Angelo. The role of α -tocopherol in preventing disease. *European Journal of Nutrition* [online]. 2004, **43**, 1-1 [cit. 2022-01-08]. ISSN 1436-6207. Dostupné z: doi:10.1007/s00394-004-1105-7.
- [53] DOUGLAS, Cheryl E., Alvin C. CHAN a Patrick C. CHOY. Vitamin E inhibits platelet phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid*

- Metabolism* [online]. 1986, **876**(3), 639-645 [cit. 2022-01-08]. ISSN 00052760. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2760(86)90053-6.
- [54] NEWMARK, Harold L., Mou-Tuan HUANG a Bandaru S. REDDY. Mixed Tocopherols Inhibit Azoxymethane-Induced Aberrant Crypt Foci in Rats. *Nutrition and Cancer* [online]. 2006, **56**(1), 82-85 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0163-5581. Dostupné z: doi:10.1207/s15327914nc5601_11.
- [55] WALLERT, Maria, Sandy MOSIG, Knut RENNERT, et al. Long-chain metabolites of α -tocopherol occur in human serum and inhibit macrophage foam cell formation in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2014, **68**, 43-51 [cit. 2022-01-07]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.009.
- [56] RICCIARELLI, Roberta, Jean-Marc ZINGG a Angelo AZZI. Vitamin E Reduces the Uptake of Oxidized LDL by Inhibiting CD36 Scavenger Receptor Expression in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation* [online]. 2000, **102**(1), 82-87 [cit. 2022-01-07]. ISSN 0009-7322. Dostupné z: doi:10.1161/01.CIR.102.1.82.
- [57] PEIN, Helmut, Alexia VILLE, Simona PACE, et al. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2022-01-07]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-06158-5.
- [58] RÅDMARK, Olof, Oliver WERZ, Dieter STEINHILBER a Bengt SAMUELSSON. 5-Lipoxygenase, a key enzyme for leukotriene biosynthesis in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2015, **1851**(4), 331-339 [cit. 2022-01-07]. ISSN 13881981. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbalip.2014.08.012.
- [59] MARTÍNEZ-CLEMENTE, Marcos, Natàlia FERRÉ, Ana GONZÁLEZ-PÉRIZ, et al. 5-lipoxygenase deficiency reduces hepatic inflammation and tumor necrosis factor α -induced hepatocyte damage in hyperlipidemia-prone ApoE-null mice. *Hepatology* [online]. 2010, **51**(3), 817-827 [cit. 2022-01-07]. ISSN 02709139. Dostupné z: doi:10.1002/hep.23463.
- [60] BIRNINGER, Marc, Dennis LINGTON, Silvia VERTUANI, Stefano MANFREDINI, Daniel SCHARLAU, Michael GLEI a Michael RISTOW. Proapoptotic effects of long-chain vitamin E metabolites in HepG2 cells are mediated by oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2010, **49**(8), 1315-1322 [cit. 2022-01-07]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.024.
- [61] WU, Dayong a Simin Nikbin MEYDANI. Vitamin E, Immune Function, and Protection Against Infection. *Vitamin E in Human Health* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2019, 2019-04-02, , 371-384 [cit. 2022-01-08]. ISBN 978-3-030-05314-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-05315-4_26.
- [62] IDDIR, Mohammed, Alex BRITO, Giulia DINGEO, Sofia Sosa FERNANDEZ DEL CAMPO, Hanen SAMOUDA, Michael R. LA FRANO a Torsten BOHN. Strengthening the Immune System and Reducing Inflammation and Oxidative Stress through Diet and

- Nutrition: Considerations during the COVID-19 Crisis. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(6) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12061562.
- [63] LEE, Ga a Sung HAN. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(11) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10111614.
- [64] RIMBACH, Gerald, Jennifer MOEHRING, Patricia HUEBBE a John K. LODGE. Gene-Regulatory Activity of α -Tocopherol. *Molecules* [online]. 2010, **15**(3), 1746-1761 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules15031746.
- [65] TORQUATO, Pierangelo, Desire BARTOLINI, Danilo GIUSEPPONI, et al. A-13'-OH is the main product of α -tocopherol metabolism and influences CYP4F2 and PPAR γ gene expression in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2016, **96**, S19-S20 [cit. 2022-01-07]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.159.
- [66] BARZEGAR-AMINI, Maral, Hamideh GHAZIZADEH, Seyed Mohammad reza SEYEDI, et al. Serum vitamin E as a significant prognostic factor in patients with dyslipidemia disorders [online]. 2019, **13**(1), 666-671 [cit. 2022-01-07]. ISSN 18714021. Dostupné z: doi:10.1016/j.dsx.2018.11.034.
- [67] GODOY-PAREJO, Carlos, Chunhao DENG, Yumeng ZHANG, Weiwei LIU a Guokai CHEN. Roles of vitamins in stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2020, **77**(9), 1771-1791 [cit. 2022-01-07]. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-019-03352-6.
- [68] SHIBATA, Akira, Yuki KAWAKAMI, Toshiyuki KIMURA, Teruo MIYAZAWA a Kiyotaka NAKAGAWA. α -Tocopherol Attenuates the Triglyceride- and Cholesterol-Lowering Effects of Rice Bran Tocotrienol in Rats Fed a Western Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2016, **64**(26), 5361-5366 [cit. 2022-01-08]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.6b02228.
- [69] TAN, Suzanne, Yilynn CHIEW, Badariah AHMAD a Khalid KADIR. Tocotrienol-Rich Vitamin E from Palm Oil (Tocovid) and Its Effects in Diabetes and Diabetic Nephropathy: A Pilot Phase II Clinical Trial. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(9) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu10091315.
- [70] WANIEK, Sabina, Romina DI GIUSEPPE, Sandra PLACHTA-DANIELZIK, et al. Association of Vitamin E Levels with Metabolic Syndrome, and MRI-Derived Body Fat Volumes and Liver Fat Content. *Nutrients* [online]. 2017, **9**(10) [cit. 2022-01-08]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9101143.
- [71] AZZI, Angelo. Antioxidants: Wonder drugs or quackery? *BioFactors* [online]. 2017, **43**(6), 785-788 [cit. 2022-01-08]. ISSN 09516433. Dostupné z: doi:10.1002/biof.1388.
- [72] YOSHIKAWA, S, T MORINOBU, K HAMAMURA, F HIRAHARA, T IWAMOTO a H TAMAI. The effect of γ -tocopherol administration on α -tocopherol levels and

- metabolism in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2005, **59**(8), 900-905 [cit. 2022-01-08]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ejcn.1602154.
- [73] MUSTACICH, Debbie J., Anh T. VO, Valerie D. ELIAS, Katie PAYNE, Laura SULLIVAN, Scott W. LEONARD a Maret G. TRABER. Regulatory mechanisms to control tissue α -tocopherol. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2007, **43**(4), 610-618 [cit. 2022-01-08]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.027.
- [74] MARCHESE, Michelle E, Rajesh KUMAR, Laura A COLANGELO, et al. The vitamin E isoforms α -tocopherol and γ -tocopherol have opposite associations with spirometric parameters: the CARDIA study. *Respiratory Research* [online]. 2014, **15**(1) [cit. 2022-01-08]. ISSN 1465-993X. Dostupné z: doi:10.1186/1465-9921-15-31.
- [75] AYRE, A. P., P. S. CHAUDHARI, J. SHAIKH, S. JAGDALE a O. AGRAWAL. DRIED MATRIX SPOTING – AN INNOVATIVE SAMPLE PREPARATION TOOL IN BIOANALYSIS. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. 2018, 01 September, 2018, **2018**(3), 3597-3607 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.9(9).3597-07.
- [76] MOAT, Stuart J., Roanna S. GEORGE a Rachel S. CARLING. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2020, **6**(2) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6020026..
- [77] Dried Blood Spot Sampling. *CAMAG* [online]. [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: <https://dbs.camag.com/>.
- [78] KEEVIL, Brian G. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry* [online]. 2011, **44**(1), 110-118 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.014.
- [79] WAGNER, Michel, David TONOLI, Emmanuel VAREGIO a Gérard HOPFGARTNER. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35**(3), 361-438 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0277-7037. Dostupné z: doi:10.1002/mas.21441.
- [80] MEI, Joanne V., J. Richard ALEXANDER, Barbara W. ADAM a W. Harry HANNON. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001, **131**(5), 1631S-1636S [cit. 2022-01-16]. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/131.5.1631S.
- [81] GRÜNER, Nico, Oumaima STAMBOULI a R. Stefan ROSS. Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2015, **97** [cit. 2022-01-16]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/52619.

- [82] BJÖRKESTEN, Johan, Stefan ENROTH, Qiujin SHEN, et al. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks [online]. 2017, **16**(7), 1286-1296 [cit. 2022-01-16]. ISSN 15359476. Dostupné z: doi:10.1074/mcp.RA117.000015.
- [83] KYLE, Jennifer E., Cameron P. CASEY, Kelly G. STRATTON, et al. Comparing identified and statistically significant lipids and polar metabolites in 15-year old serum and dried blood spot samples for longitudinal studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2017, **31**(5), 447-456 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.7808.
- [84] ADAM, B.W., E.M. HALL, M. STERNBERG, et al. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clinical Biochemistry* [online]. 2011, **44**(17-18), 1445-1450 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.09.010.
- [85] CORDOVADO, Suzanne K., Marie C. EARLEY, Miyono HENDRIX, Rena DRISCOLL-DUNN, Michael GLASS, Patricia W. MUELLER a W. Harry HANNON. Assessment of DNA contamination from dried blood spots and determination of DNA yield and function using archival newborn dried blood spots. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2009, **402**(1-2), 107-113 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2008.12.028.
- [86] HAN, Jun, Rehan HIGGINS, Mark D LIM, Karen LIN, Juncong YANG a Christoph H BORCHERS. Short-Term Stabilities of 21 Amino Acids in Dried Blood Spots. *Clinical Chemistry* [online]. 2018, **64**(2), 400-402 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2017.278457.
- [87] GOLBAHAR, J, DD ALTAYAB a E CARREON. Short-Term Stability of Amino acids and Acylcarnitines in the Dried Blood Spots Used to Screen Newborns for Metabolic Disorders. *Journal of Medical Screening* [online]. 2014, **21**(1), 5-9 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0969-1413. Dostupné z: doi:10.1177/0969141314525367.
- [88] SUPRIYA, Manjunath, Tanima DE a Rita CHRISTOPHER. Effect of temperature on lysosomal enzyme activity during preparation and storage of dried blood spots. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* [online]. 2018, **32**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 08878013. Dostupné z: doi:10.1002/jcla.22220.
- [89] ADAM, B.W., J.J. ORSINI, M. MARTIN, E.M. HALL, S.D. ZOBEL, M. CAGGANA a W.H. HANNON. The preparation and storage of dried-blood spot quality control materials for lysosomal storage disease screening tests. *Clinical Biochemistry* [online]. 2011, **44**(8-9), 704-710 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.02.014.
- [90] CHEN, Xiaohui, Hongjuan ZHAO, Panos HATSIS a Jakal AMIN. Investigation of dried blood spot card-induced interferences in liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, **61**, 30-37 [cit. 2022-01-16]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2011.11.015.

- [91] LI, Wenkui a Francis L. S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **24**(1), 49-65 [cit. 2022-01-16]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.1367.
- [92] LIM, Mark D. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. 2018, **99**(2), 256-265 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0002-9637. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.17-0889.
- [93] World Health Organization, 2005. Module 14: Blood Collection and Handling—Dried Blood Spot (DBS). Available at: http://www.who.int/diagnostics_laboratory/documents/guidance/pm_module14.pdf. Accessed January, 16, 2021..
- [94] MURPHY, S. C., G. DAZA, M. CHANG a R. COOMBS. Laser Cutting Eliminates Nucleic Acid Cross-Contamination in Dried-Blood-Spot Processing. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2012, **50**(12), 4128-4130 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.02549-12.
- [95] LI, Fumin, Stephen PLOCH, Douglas FAST a Steve MICHAEL. Perforated dried blood spot accurate microsampling: the concept and its applications in toxicokinetic sample collection. *Journal of Mass Spectrometry* [online]. 2012, **47**(5), 655-667 [cit. 2022-01-16]. ISSN 10765174. Dostupné z: doi:10.1002/jms.3015.
- [96] OLIVEIRA, Elcio Cruz de, Edson I. MULLER, Fernanda ABAD, Juliana DALLAROSA a Cristine ADRIANO. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. *Química Nova* [online]. 2010, **33**(4), 984-987 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0100-4042. Dostupné z: doi:10.1590/S0100-40422010000400041.
- [97] GANZ, Norbert, Maharajah SINGRASA, Laurent NICOLAS, Marcelo GUTIERREZ, Jasper DINGEMANSE, Werner DÖBELIN a Mirko GLINSKI. Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the Sample Card And Prep DBS System. *Journal of Chromatography B* [online]. 2012, 885-886, **50-60** [cit. 2022-01-16]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2011.12.012.
- [98] BODAMER, Olaf A. Screening for Phenylketonuria. *Annales Nestlé* (English ed.) [online]. 2010, **68**(2), 53-57 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1661-4011. Dostupné z: doi:10.1159/000312812.
- [99] GELB, Michael, Zoltan LUKACS, Enzo RANIERI a Peter SCHIELEN. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders: Methodologies for Measurement of Enzymatic Activities in Dried Blood Spots. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2019, **5**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns5010001.

- [100] PKU-TEST. Dr. Robert Guthrie – “Father” of mass newborn screening [online]. 2022 [cit. 2022-16-01]. Dostupné z: <http://www.pkutest.com/2012/07/22/dr-robert-guthriefather-mass-newborn-screening/>.
- [101] Co je novorozenecký screening. Novorozenecký screening [online]. 2013 [cit. 2022-01-16]. Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening>.
- [102] NIEMIEC, Agnieszka. Dried Blood Spot in Toxicology: Current Knowledge. *Separations* [online]. 2021, **8**(9) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations8090145.
- [103] KUEHN, Bridget M. After 50 Years, Newborn Screening Continues to Yield Public Health Gains. *JAMA* [online]. 2013, **309**(12) [cit. 2022-01-16]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2013.2087.
- [104] Zakaria R, Allen KJ, Koplín JJ, Roche P, Greaves RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC*. 2016 Dec 1;**27**(4):288-317.
- [105] MARTIAL, Lisa C., Rob E. AARNOUTSE, Michiel F. SCHREUDER, Stefanie S. HENRIET, Roger J. M. BRÜGGEMANN, Manuela A. JOORE a Ewout W STEYERBERG. Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children. *PLOS ONE* [online]. 2016, **11**(12) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0167433.
- [106] VAN LOO, Inge H. M., Nicole H. T. M. DUKERS-MUIJRS, Rosalie HEUTS, Marianne A. B. VAN DER SANDE, Christian J. P. A. HOEBE a Yury E KHUDYAKOV. Screening for HIV, hepatitis B and syphilis on dried blood spots: A promising method to better reach hidden high-risk populations with self-collected sampling. *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(10) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0186722.
- [107] JURADO, C. Blood. Encyclopedia of Forensic Sciences [online]. *Elsevier*, 2013, 336-342 [cit. 2022-01-16]. ISBN 9780123821669. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-382165-2.00301-9.
- [108] DE KESEL, Pieter MM, Nele SADONES, Sara CAPIAU, Willy E LAMBERT a Christophe P STOVE. Hemato-critical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(16), 2023-2041 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.13.156.
- [109] CHAO, Tzu Chieh, Anna TRYBALA, Victor STAROV a Diganta B. DAS. Influence of haematocrit level on the kinetics of blood spreading on thin porous medium during dried blood spot sampling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, **451**, 38-47 [cit. 2022-01-16]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2014.03.033.

- [110] O'MARA, M, B HUDSON-CURTIS, K OLSON, Y YUEH, J DUNN a N SPOONER. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis* [online]. 2011, **3**(20), 2335-2347 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio.11.220.
- [111] AYLWARD, Lesa L., Sean M. HAYS, Roel SMOLDERS, et al. Sources of Variability in Biomarker Concentrations. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* [online]. 2014, **17**(1), 45-61 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1093-7404. Dostupné z: doi:10.1080/10937404.2013.864250.
- [112] TANG, Ruihua, Hui YANG, Jane Ru CHOI, et al. Capillary blood for point-of-care testing. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2017, **54**(5), 294-308 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1040-8363. Dostupné z: doi:10.1080/10408363.2017.1343796.
- [113] SPOONER, N., A. OLATUNJI a K. WEBBLEY. Investigation of the effect of blood hematocrit and lipid content on the blood volume deposited by a disposable dried blood spot collection device. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **149**, 419-424 [cit. 2022-01-16]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2017.11.036.
- [114] POLLEY, Spencer D, David BELL, James OLIVER, Frank TULLY, Mark D PERKINS, Peter L CHIODINI a Iveth J GONZÁLEZ. The design and evaluation of a shaped filter collection device to sample and store defined volume dried blood spots from finger pricks. *Malaria Journal* [online]. 2015, **14**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1475-2875. Dostupné z: doi:10.1186/s12936-015-0558-x.
- [115] FANG, Kasie, Chester L BOWEN, John F KELLIE, Molly Z KARLINSEY a Christopher A EVANS. Drug monitoring by volumetric absorptive microsampling: method development considerations to mitigate hematocrit effects. *Bioanalysis* [online]. 2018, **10**(4), 241-255 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2017-0221.
- [116] CHERNONOSOV, Alexander. The Use of Dried Blood Spots for the Quantification of Antihypertensive Drugs. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2018, 1-12 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3235072.
- [117] LEHMANN, Rainer. Pre-analytics in biomedical metabolomics. *Metabolomics for Biomedical Research* [online]. *Elsevier*, 2020, 33-56 [cit. 2022-01-16]. ISBN 9780128127841. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-812784-1.00003-7.
- [118] CAGGANA, Michele, Elizabeth A. JONES, S.I. SHAHIED, Susan TANKSLEY, Cheryl A. HERMERATH a Ira M. LUBIN. Newborn Screening: From Guthrie to *Whole Genome Sequencing*. *Public Health Reports* [online]. 2013, **128**(2_suppl), 14-19 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0033-3549. Dostupné z: doi:10.1177/00333549131280S204.
- [119] MAK, Chloe Miu, Han-Chih Hencher LEE, Albert Yan-Wo CHAN a Ching-Wan LAM. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2013, **50**(6), 142-162 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1040-8363. Dostupné z: doi:10.3109/10408363.2013.847896.

- [120] BAMFORTH, F. Newborn Screening of Genetic Diseases. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* [online]. Elsevier, 2012, 189-210 [cit. 2022-01-16]. ISBN 9780123813749. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-381373-2.00073-9.
- [121] TRAVERT, Georges, Mary HEELEY a Anthony HEELEY. History of Newborn Screening for Cystic Fibrosis—The Early Years. *International Journal of Neonatal Screening* [online]. 2020, **6**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2409-515X. Dostupné z: doi:10.3390/ijns6010008.
- [122] MALSAGOVA, Kristina, Artur KOPYLOV, Alexander STEPANOV, Tatyana BUTKOVA, Alexander IZOTOV a Anna KAYSHEVA. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics* [online]. 2020, **10**(4) [cit. 2022-01-16]. ISSN 2075-4418. Dostupné z: doi:10.3390/diagnostics10040248.
- [123] STRENGER, Volker, Klaus PFURTSCHELLER, Gerald WENDELIN, et al. Differentiating Inherited Human Herpesvirus Type 6 Genome from Primary Human Herpesvirus Type 6 Infection by Means of Dried Blood Spot from the Newborn Screening Card. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2011, **159**(5), 859-861 [cit. 2022-01-16]. ISSN 00223476. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpeds.2011.06.032.
- [124] KENMOE, Sebastien, Paul Alain Ngoupo TAGNOUOKAM, Cyprien Kengne NDE, Ghislaine Flore MELLA-TAMKO a Richard NJOUOM. Using dried blood spot for the detection of HBsAg and anti-HCV antibodies in Cameroon. *BMC Research Notes* [online]. 2018, **11**(1) [cit. 2022-01-16]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/s13104-018-3931-3.
- [125] FACHIROH, J., P. R. PRASETYANTI, D. K. PARAMITA, A. T. PRASETYAWATI, D. W. ANGGRAHINI, S. M. HARYANA a J. M. MIDDELDORP. Dried-Blood Sampling for Epstein-Barr Virus Immunoglobulin G (IgG) and IgA Serology in Nasopharyngeal Carcinoma Screening. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2008, **46**(4), 1374-1380 [cit. 2022-01-16]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01368-07.
- [126] TUAILLON, Edouard, Dramane KANIA, Amandine PISONI, et al. Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, **11** [cit. 2022-01-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.00373.
- [127] FONTAINE, Elizabeth a Cristian SAEZ. Analysis of SARS-CoV-2 antibodies from dried blood spot samples with the Roche Elecsys Immunochemistry method. *Practical Laboratory Medicine* [online]. 2021, **25** [cit. 2022-01-16]. ISSN 23525517. Dostupné z: doi:10.1016/j.plabm.2021.e00234.
- [128] WEISSER, Heike, Katja STEINHAGEN, Ralf HÖCKER, Viola BORCHARDT-LOHÖLTER, Özlem ANVARI a Peter M. KERN. Evaluation of dried blood spots as alternative sampling material for serological detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using established ELISAs. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2021, **59**(5), 979-985 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1434-6621. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2020-1436.

- [129] ZAVA, Theodore T a David T ZAVA. Validation of dried blood spot sample modifications to two commercially available COVID-19 IgG antibody immunoassays. *Bioanalysis* [online]. 2021, **13**(1), 13-28 [cit. 2022-01-16]. ISSN 1757-6180. Dostupné z: doi:10.4155/bio-2020-0289.
- [130] YANG, J.Y. a D.A. HEROLD. Evolving platforms for clinical mass spectrometry. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* [online]. *Elsevier*, 2017, 261-276 [cit. 2022-01-13]. ISBN 9780128008713. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800871-3.00013-4.
- [131] COELHO, Margarida, Vera M. MENDES, Inês S. LIMA, Fátima O. MARTINS, Ana B. FERNANDES, M. Paula MACEDO, John G. JONES a Bruno MANADAS. Direct analysis of [6,6-2H₂]glucose and [U-13C₆]glucose dry blood spot enrichments by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* [online]. 2016, **1022**, 242-248 [cit. 2022-01-16]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2016.04.027.
- [132] CERVINKOVA, Barbora, Lenka Kujovska KRCMOVA, Dagmar SOLICHOVA, Bohuslav MELICHAR a Petr SOLICH. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, **408**(10), 2407-2424 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-015-9214-0.
- [133] RUPÉREZ, F.J, D MARTÍN, E HERRERA a C BARBAS. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **935**(1-2), 45-69 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)01101-3.
- [134] GREBENSTEIN, Nadine a Jan FRANK. Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1243**, 39-46 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.04.042.
- [135] CHATZIMICHALAKIS, Pavlos F, Victoria F SAMANIDOU a Ioannis N PAPADOYANNIS. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **805**(2), 289-296 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2004.03.009.
- [136] BURTON, Graham W., Ann WEBB a Keith U. INGOLD. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. *Lipids* [online]. 1985, **20**(1), 29-39 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/BF02534359.
- [137] MONTERO, Olimpio, María RAMÍREZ, Alberto SÁNCHEZ-GUIJO a Constancio GONZÁLEZ. Determination of lipoic acid, Trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry.

- Biomedical Chromatography* [online]. 2012, **26**(10), 1228-1233 [cit. 2022-01-27]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.2683.
- [138] ANDREOLI, Roberta, Paola MANINI, Diana POLI, Enrico BERGAMASCHI, Antonio MUTTI a Wilfried M. A. NIESSEN. Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, α -tocopherol, and β -carotene in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2004, **378**(4), 987-994 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-003-2288-0.
- [139] RODEMEISTER, Sandra, Mathieu DUQUESNE, Michael ADOLPH, Donatus NOHR, Hans K. BIESALSKI a Klaus UNERTL. Massive and long-lasting decrease in vitamin C plasma levels as a consequence of extracorporeal circulation. *Nutrition* [online]. 2014, **30**(6), 673-678 [cit. 2022-01-27]. ISSN 08999007. Dostupné z: doi:10.1016/j.nut.2013.10.026.
- [140] PALIAKOV, Ekaterina M., Brian S. CROW, Michael J. BISHOP, Dean NORTON, Joe GEORGE a J. Alexander BRALLEY. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(1-2), 89-94 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2008.11.012.
- [141] ŘIMNÁČOVÁ, L., P. HUŠEK a P. ŠIMEK. A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1339**, 154-167 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2014.03.007.
- [142] ROMEU-NADAL, M., S. MORERA-PONS, A.I. CASTELLOTE a M.C. LÓPEZ-SABATER. Determination of γ - and α -tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV–vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, **1114**(1), 132-137 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.02.049.
- [143] LI, Guang-Xun, Mao-Jung LEE, Anna B. LIU, Zhihong YANG, Yong LIN, Weichung J. SHIH a Chung S. YANG. Δ -Tocopherol Is More Active than α - or γ -Tocopherol in Inhibiting Lung Tumorigenesis In Vivo. *Cancer Prevention Research* [online]. 2011, **4**(3), 404-413 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1940-6207. Dostupné z: doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0130.
- [144] MORINOBU, T, S YOSHIKAWA, K HAMAMURA a H TAMAI. Measurement of vitamin E metabolites by high-performance liquid chromatography during high-dose administration of α -tocopherol. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, **57**(3), 410-414 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0954-3007. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ejcn.1601570.

- [145] LEE, Bee-Lan, Ai-Li NEW a Choon-Nam ONG. Simultaneous Determination of Tocotrienols, Tocopherols, Retinol, and Major Carotenoids in Human Plasma. *Clinical Chemistry* [online]. 2003, **49**(12), 2056-2066 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2003.022681..
- [146] MOLTÓ-PUIGMARTÍ, Carolina, Ana Isabel CASTELLOTE a M. Carmen LÓPEZ-SABATER. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatographic method for the analysis of tocopherols in human colostrum and milk. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(20), 4388-4394 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2009.02.088.
- [147] SILUK, Danuta, Regina V. OLIVEIRA, Maria ESTHER-RODRIGUEZ-ROSAS, Shari LING, Angelo BOS, Luigi FERRUCCI a Irving W. WAINER. A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **44**(4), 1001-1007 [cit. 2022-01-27]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2007.03.033.
- [148] Korchazhkina O, Jones E, Czauderna M, Spencer SA, Kowalczyk J (2006) HPLC with UV detection for measurement of vitamin E in human milk. *Acta Chromatogr* **16**:48–57.
- [149] Vatassery GT (1994) Determination of tocopherols and tocopherolquinone in human-red blood-cell and platelet samples. *Methods Enzymol* 234:327–331.
- [150] DROTLEFF, Astrid M., Christoph BOHNSACK, Inga SCHNEIDER, Andreas HAHN a Waldemar TERNES. Human oral bioavailability and pharmacokinetics of tocotrienols from tocotrienol-rich (tocopherol-low) barley oil and palm oil formulations. *Journal of Functional Foods* [online]. 2014, **7**, 150-160 [cit. 2022-01-27]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2014.01.001.
- [151] VIÑAS, Pilar, María BRAVO-BRAVO, Ignacio LÓPEZ-GARCÍA, Marta PASTOR-BELDA a Manuel HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. Pressurized liquid extraction and dispersive liquid–liquid microextraction for determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods by liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection. *Talanta* [online]. 2014, **119**, 98-104 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.10.053.
- [152] ZIEGLER, Jochen U., Ralf M. SCHWEIGGERT a Reinhold CARLE. A method for the simultaneous extraction and quantitation of lipophilic antioxidants in *Triticum* sp. by HPLC-DAD/FLD-MSn. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2015, **39**, 94-102 [cit. 2022-01-27]. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2014.11.011.
- [153] ZARROUK, Wissem, Alegría CARRASCO-PANCORBO, Mokhtar ZARROUK, Antonio SEGURA-CARRETERO a Alberto FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. Multi-component analysis (sterols, tocopherols and triterpenic dialcohols) of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–ion trap mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2009, **80**(2),

- 924-934 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2009.08.022.
- [154] ZHAO, Yang, Mao-Jung LEE, Connie CHEUNG, Ji-Hyeung JU, Yu-Kuo CHEN, Ba LIU, Long-Qin HU a Chung S. YANG. Analysis of Multiple Metabolites of Tocopherols and Tocotrienols in Mice and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2010, **58**(8), 4844-4852 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf904464u.
- [155] PANFILI, Gianfranco, Alessandra FRATIANNI a Mario IRANO. Normal Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Tocopherols and Tocotrienols in Cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2003, **51**(14), 3940-3944 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf030009v.
- [156] KRAMER, John K. G., Lisa BLAIS, Robert C. FOUCHARD, Roman A. MELNYK a Krishna M. R. KALLURY. A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by high-performance liquid chromatography using a normal-phase diol column. *Lipids* [online]. 1997, **32**(3), 323-330 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0024-4201. Dostupné z: doi:10.1007/s11745-997-0040-1.
- [157] FRATIANNI, Alessandra, Maria CABONI, Mario IRANO a Gianfranco PANFILI. A critical comparison between traditional methods and supercritical carbon dioxide extraction for the determination of tocopherols in cereals. *European Food Research and Technology* [online]. 2002, **215**(4), 353-358 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-002-0566-2.
- [158] MELCHERT, H.-U a E PABEL. Quantitative determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **896**(1-2), 209-215 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00682-8.
- [159] PRIEGO CAPOTE, Feliciano, José Ruiz JIMÉNEZ, José María Mata GRANADOS a María Dolores Luque DE CASTRO. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2007, **21**(11), 1745-1754 [cit. 2022-01-27]. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.3014.
- [160] MELCHERT, H.-U, D POLLOK, E PABEL, K RUBACH a H.-J STAN. Determination of tocopherols, tocopherolquinones and tocopherolhydroquinones by gas chromatography–mass spectrometry and pre-separation with lipophilic gel chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **976**(1-2), 215-220 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(02)00941-X.
- [161] KRČMOVÁ, Lenka, Lubor URBÁNEK, Dagmar SOLICHOVÁ, Markéta KAŠPAROVÁ, Hana VLČKOVÁ, Bohuslav MELICHAR, Luboš SOBOTKA a Petr SOLICH. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in

- human serum for monitoring of anticancer therapy. *Journal of Separation Science* [online]. 2009, **32**(15-16), 2804-2811 [cit. 2022-01-27]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200900239.
- [162] KRČMOVÁ, Lenka, Dagmar SOLICHOVÁ, Jiří PLÍŠEK, Markéta KAŠPAROVÁ, Luboš SOBOTKA a Petr SOLICH. Miniaturisation of solid phase extraction method for determination of retinol, alpha- and gamma-tocopherol in human serum using new technologies. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2010, **90**(2), 106-114 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0306-7319. Dostupné z: doi:10.1080/03067310903267299.
- [163] MATA-GRANADOS, J.M, M.D LUQUE DE CASTRO a J.M QUESADA. Fully automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in human serum by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2004, **35**(3), 575-582 [cit. 2022-01-27]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2004.01.027.
- [164] KAND'ÁR, Roman, Pavla NOVOTNÁ a Petra DRÁBKOVÁ. Determination of Retinol, α -Tocopherol, Lycopene, and β -Carotene in Human Plasma Using HPLC with UV-Vis Detection: Application to a Clinical Study. *Journal of Chemistry* [online]. 2013, 2013, 1-7 [cit. 2022-01-27]. ISSN 2090-9063. Dostupné z: doi:10.1155/2013/460242.
- [165] CIMADEVILLA, Henar M., David HEVIA, Ana MIAR, Juan C. MAYO, Felipe LOMBO a Rosa M. SAINZ. Development and validation of a single HPLC method for determination of α -tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomedical Chromatography* [online]. 2015, **29**(6), 843-852 [cit. 2022-01-27]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.3362.
- [166] GIMENO, E, A.I CASTELLOTE, R.M LAMUELA-RAVENTÓS, M.C DE LA TORRE-BORONAT a M.C LÓPEZ-SABATER. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in human plasma and low-density lipoproteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2001, **758**(2), 315-322 [cit. 2022-01-27]. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(01)00202-X.
- [167] RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A, J.F DÍAZ-FLORES ESTÉVEZ, F DÍAZ-FLORES ESTÉVEZ, C HERNÁNDEZ CALZADILLA a C DÍAZ ROMERO. Fast determination of retinol and α -tocopherol in plasma by LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2002, **28**(5), 991-997 [cit. 2022-01-27]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/S0731-7085(02)00051-1.
- [168] ZHANG, Haifeng, Li QUAN, Pei PEI, et al. Simultaneous determination of Vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D 3 α -tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2018, **1079**, 1-8 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.12.017.

- [169] MIDTTUN, Øivind a Per M. UELAND. Determination of vitamins A, D and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2011, **25**(14), 1942-1948 [cit. 2022-01-27]. ISSN 09514198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.5073.
- [170] AKSNES, Lage. Simultaneous Determination of Retinol, α -Tocopherol, and 25-Hydroxyvitamin D in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [online]. 1994, **18**(3), 339-343 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0277-2116. Dostupné z: doi:10.1097/00005176-199404000-00015.
- [171] SEMERARO, Antonella, Ilaria ALTIERI, Marina PATRIARCA a Antonio MENDITTO. Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(11-12), 1209-1215 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2009.02.063.
- [172] Hatam LJ, Kayden HJ. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res.* 1979 Jul;**20**(5):639-45.
- [173] VATASSERY, G.T., W.E. SMITH a H.T. QUACH. A Liquid Chromatographic Method for the Simultaneous Determination of α -Tocopherol and Tocopherolquinone in Human Red Blood Cells and Other Biological Samples where Tocopherol Is Easily Oxidized during Sample Treatment. *Analytical Biochemistry* [online]. 1993, **214**(2), 426-430 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.1993.1518.
- [174] KAŠPAROVÁ, Markéta, Jiří PLÍŠEK, Dagmar SOLICHOVÁ, Lenka KRČMOVÁ, Barbora KUČEROVÁ, Miloslav HRONEK a Petr SOLICH. Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and α -tocopherol in human breast milk. *Talanta* [online]. 2012, **93**, 147-152 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2012.01.065.
- [175] LE (乐娟), Juan, Teng-Fei YUAN (袁腾飞), Yan ZHANG (张艳), Shao-Ting WANG (王少亭) a Yan LI (李艳). New LC-MS/MS method with single-step pretreatment analyzes fat-soluble vitamins in plasma and amniotic fluid. *Journal of Lipid Research* [online]. 2018, **59**(9), 1783-1790 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D087569.
- [176] RISS, Georges, Alfred W. KORMANN, Ernst GLINZ, Willi WALTHER a Urs B. RANALDER. [26] Separation of the eight stereoisomers of all-rac- α -tocopherol from tissues and plasma: Chiral phase high-performance liquid chromatography and capillary gas chromatography. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part D* [online]. Elsevier, 1994, 302-310 [cit. 2022-01-27]. Methods in Enzymology. ISBN 9780121821357. Dostupné z: doi:10.1016/0076-6879(94)34097-8.
- [177] HÖLLER, Ulrich, Stephan J.L. BAKKER, Andre DÜSTERLOH, et al. Micronutrient status assessment in humans: Current methods of analysis and future trends. *TrAC*

- Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2018, **102**, 110-122 [cit. 2022-01-27]. ISSN 01659936. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2018.02.001.
- [178] FU, Ju-Yen, Thet-Thet HTAR, Leanne DE SILVA, Doryn TAN a Lay-Hong CHUAH. Chromatographic Separation of Vitamin E Enantiomers. *Molecules* [online]. 2017, **22**(2) [cit. 2022-01-27]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22020233.
- [179] KANĎÁR, R., P. DRÁBKOVÁ, K. MYSLÍKOVÁ a R. HAMPL. Determination of retinol and α -tocopherol in human seminal plasma using an HPLC with UV detection. *Andrologia* [online]. 2014, **46**(5), 472-478 [cit. 2022-01-27]. ISSN 03034569. Dostupné z: doi:10.1111/and.12103.
- [180] VATASSERY, Govind T., ADITYANJEE, Hung T. QUACH, W. Ed SMITH, Michael A. KUSKOWSKI a Dean MELNYK. Alpha and Gamma Tocopherols in Cerebrospinal Fluid and Serum from Older, Male, Human Subjects. *Journal of the American College of Nutrition* [online]. 2004, **23**(3), 233-238 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0731-5724. Dostupné z: doi:10.1080/07315724.2004.10719366.
- [181] PLÍŠEK, Jiří, Markéta KAŠPAROVÁ, Dagmar SOLICHOVÁ, Lenka KRČMOVÁ, Barbora KUČEROVÁ, Luboš SOBOTKA a Petr SOLICH. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. *Talanta* [online]. 2013, **107**, 382-388 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00399140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2013.01.031.
- [182] MATA-GRANADOS, J.M., J.M. QUESADA GÓMEZ a M.D. LUQUE DE CASTRO. Fully automatic method for the determination of fat soluble vitamins and vitamin D metabolites in serum. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2009, **403**(1-2), 126-130 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2009.01.029.
- [183] GRANADO-LORENCIO, F, C HERRERO-BARBUDO, I BLANCO-NAVARRO a B PÉREZ-SACRISTÁN. Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2010, **397**(3), 1389-1393 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3655-2.
- [184] KHAN, Muhammad I., Abad KHAN, Zafar IQBAL, Lateef AHMAD a Yasar SHAH. Optimization and Validation of RP-LC/UV-VIS Detection Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Anti-Oxidant Vitamins, all-trans-Retinol and α -Tocopherol in Human Serum: Effect of Experimental Parameters. *Chromatographia* [online]. 2010, **71**(7-8), 577-586 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1365/s10337-010-1486-0.
- [185] BELL, E. C., M. JOHN, R. J. HUGHES a T. PHAM. Ultra-Performance Liquid Chromatographic Determination of Tocopherols and Retinol in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2014, **52**(9), 1065-1070 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmt161.

- [186] TAIBI, G a C.M.A NICOTRA. 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. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, **780**(2), 261-267 [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(02)00529-9.
- [187] PEERSMAN, Nele, Jan Van ELSLANDE, Yannick LEPAGE, Samira DE AMICIS, Koenraad DESMET a Pieter VERMEERSCH. UPLC-MS/MS method for determination of retinol and α -tocopherol in serum using a simple sample pretreatment and UniSpray as ionization technique to reduce matrix effects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2020, **58**(5), 769-779 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2019-1237.
- [188] KARAŻNIEWICZ-ŁADA, Marta a Anna GŁÓWKA. A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids. *Journal of Separation Science* [online]. 2016, **39**(1), 132-148 [cit. 2022-01-27]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201501038.
- [189] SAHA, Supradip, Suresh WALIA, Aditi KUNDU a Niti PATHAK. Effect of mobile phase on resolution of the isomers and homologues of tocopherols on a triacontyl stationary phase. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2013, **405**(28), 9285-9295 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-013-7336-9.
- [190] ABIDI, S.L. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A* [online]. 2000, **881**(1-2), 197-216 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)00131-X.
- [191] CITOVÁ, I., L. HAVLÍKOVÁ, L. URBÁNEK, D. SOLICHOVÁ, L. NOVÁKOVÁ a P. SOLICH. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, **388**(3), 675-681 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1237-8.
- [192] LAZZARINO, Giacomo, Salvatore LONGO, Angela Maria AMORINI, Valentina DI PIETRO, Serafina D'URSO, Giuseppe LAZZARINO, Antonio BELLI a Barbara TAVAZZI. Single-step preparation of selected biological fluids for the high performance liquid chromatographic analysis of fat-soluble vitamins and antioxidants. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1527**, 43-52 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.10.053.
- [193] RAMMELL, Colin G., B. CUNLIFFE a A. J. KIEBOOM. Determination of Alpha-Tocopherol in Biological Specimens by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* [online]. 2006, **6**(6), 1123-1130 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0148-3919. Dostupné z: doi:10.1080/01483918308076094.
- [194] TEISSIER, E, E WALTERS-LAPORTE, C DUHEM, G LUC, J C FRUCHART a P DURIEZ. Rapid quantification of alpha-tocopherol in plasma and low- and high-density

- lipoproteins. *Clinical Chemistry* [online]. 1996, **42**(3), 430-435 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/42.3.430.
- [195] ZIYATDINOVA, G. K., E. R. GINIYATOVA a H. C. BUDNIKOV. Voltammetric determination of α -tocopherol in the presence of surfactants. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **67**(5), 467-473 [cit. 2022-01-27]. ISSN 1061-9348. Dostupné z: doi:10.1134/S1061934812030148.
- [196] NAGY, Kornél, Marie-Claude COURTET-COMPONDU, Birgit HOLST a Martin KUSSMANN. Comprehensive Analysis of Vitamin E Constituents in Human Plasma by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(18), 7087-7096 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac0708689.
- [197] THOMSON, Bruce A. Atmospheric pressure ionization and liquid chromatography/mass spectrometry—together at last. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 1998, **9**(3), 187-193 [cit. 2022-02-23]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(97)00285-7.
- [198] E. C. Horning; ,; M. G. Horning; ,; D. I. Carroll; ,; I. Dzidic; , and; R. N. Stillwell. *Analytical Chemistry* 1973, **45**, 6, 936-943.
- [199] FENN, John B., Matthias MANN, Chin Kai MENG, Shek Fu WONG a Craig M. WHITEHOUSE. Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* [online]. 1989, **246**(4926), 64-71 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.2675315.
- [200] KEBARLE, Paul a Liang TANG. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 1993, **65**(22), 972A-986A [cit. 2022-02-23]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00070a001.
- [201] YAMASHITA, Masamichi a John B. FENN. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1984, **88**(20), 4451-4459 [cit. 2022-02-23]. ISSN 0022-3654. Dostupné z: doi:10.1021/j150664a002.
- [202] HINCHLIFFE, Edward, James RUDGE a Paul REED. A novel high-throughput method for supported liquid extraction of retinol and alpha-tocopherol from human serum and simultaneous quantitation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* [online]. 2016, **53**(4), 434-445 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0004-5632. Dostupné z: doi:10.1177/0004563215596024.
- [203] ALBAHRANI, Ali A., Victor ROTAROU, Peter J. ROCHE a Ronda F. GREAVES. A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2016, **159**, 41-53 [cit. 2022-01-27]. ISSN 09600760. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2016.02.019.

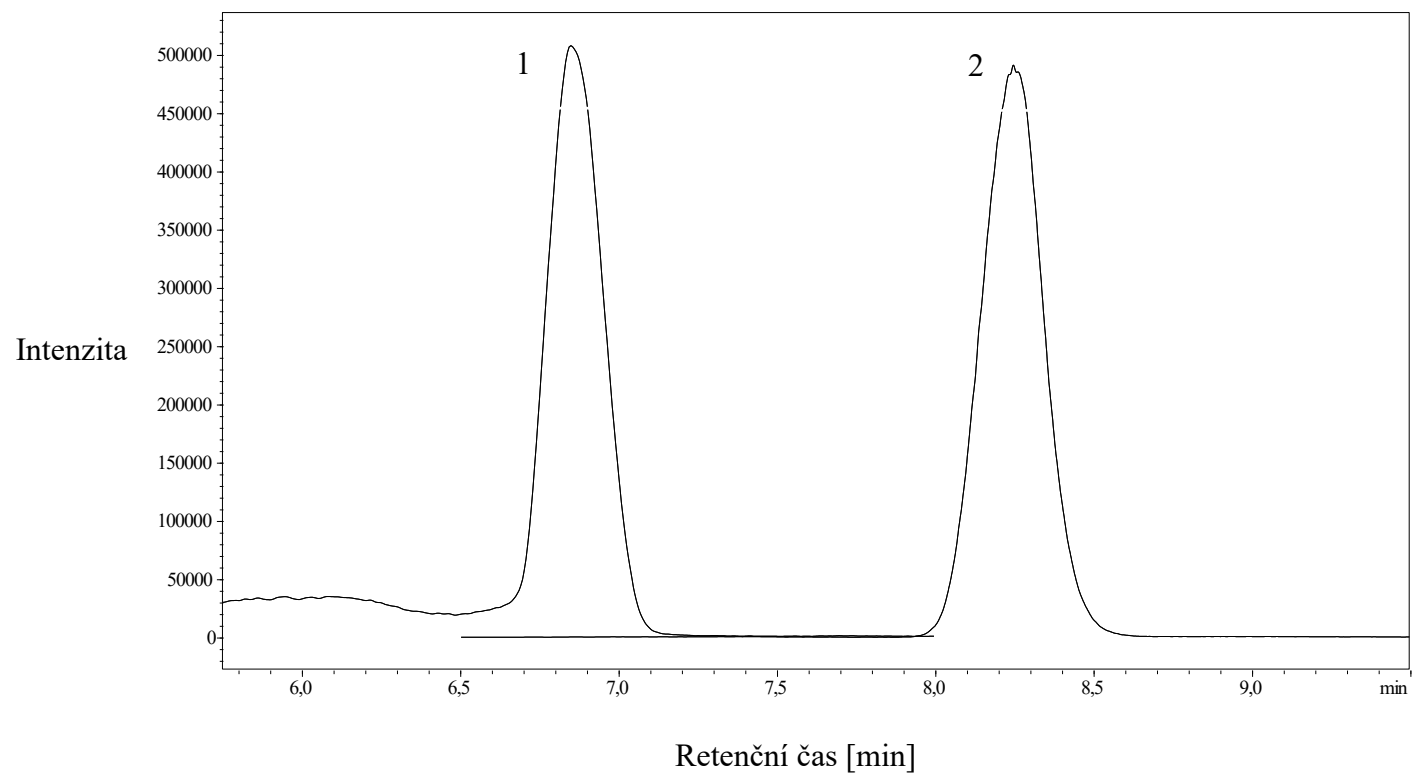
- [204] LANINA, Svetlana A., Patricia TOLEDO, Sabine SAMPELS, Afaf KAMAL-ELDIN a Jelena A. JASTREBOVA. Comparison of reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1157**(1-2), 159-170 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.04.058.
- [205] BANERJEE, Shibdas a Shyamalava MAZUMDAR. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, 1-40 [cit. 2022-04-13]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2012/282574
- [206] BARTOSIŃSKA, E., M. BUSZEWSKA-FORAJTA a D. SILUK. GC–MS and LC–MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **127**, 156-169 [cit. 2022-01-27]. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2016.02.051.
- [207] TANG, Chuanhui, Guanjun TAO, Yue WANG, Yuanfa LIU a Jinwei LI. Identification of α -Tocopherol and Its Oxidation Products by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2020, **68**(2), 669-677 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.9b06544.
- [208] WIITA, Arun P., Julia E. SEAMAN a James A. WELLS. Global Analysis of Cellular Proteolysis by Selective Enzymatic Labeling of Protein N-Termini. Regulated Cell Death Part A: Apoptotic Mechanisms [online]. *Elsevier*, 2014, 327-358 [cit. 2022-02-25]. *Methods in Enzymology*. ISBN 9780124171589. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-417158-9.00013-3.
- [209] DRABOVICH, Andrei P., Maria P. PAVLOU, Ihor BATRUCH a Eleftherios P. DIAMANDIS. Proteomic and mass spectrometry technologies for biomarker discovery. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* [online]. *Elsevier*, 2013, 17-37 [cit. 2022-02-25]. ISBN 9780128186077. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-818607-7.00002-5.
- [210] JIANG, Qing, Tianlin XU, Jianjie HUANG, Amber S. JANNASCH, Bruce COOPER a Chao YANG. Analysis of vitamin E metabolites including carboxychromanols and sulfated derivatives using LC/MS/MS. *Journal of Lipid Research* [online]. 2015, **56**(11), 2217-2225 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D061663.
- [211] YOU, Jingjing, Mark D. WILLCOX, Michele C. MADIGAN, et al. Tear Fluid Protein Biomarkers [online]. *Elsevier*, 2013, 151-196 [cit. 2022-02-25]. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780128000960. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800096-0.00004-4.
- [212] GOH, Kok Ming, Yu Hua WONG, May Yen ANG, Samuel Chao Ming YEO, Faridah ABAS, Oi Ming LAI a Chin Ping TAN. Comparison assessment between SIM and MRM mode in the analysis of 3-MCPD ester, 2-MCPD ester and glycidyl ester. *Food*

- Research International* [online]. 2019, **121**, 553-560 [cit. 2022-02-25]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2018.12.013.
- [213] BERETOV, Julia, Valerie C. WASINGER, Peter H. GRAHAM, Ewan K. MILLAR, John H. KEARSLEY a Yong LI. Proteomics for Breast Cancer Urine Biomarkers [online]. *Elsevier*, 2014, 123-167 [cit. 2022-02-25]. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780128000946. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800094-6.00004-2.
- [214] TUUR Mertens, Optimizing analysis of (modified) Fusarium mycotoxins in diverse samples from the brewing process- Scientific Figure on *ResearchGate*, 2016, available from: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-diagram-of-a-triple-quadrupole-mass-spectrometer_fig13_315673618 [accessed 13 Apr, 2022]
- [215] TYŚKIEWICZ, Katarzyna, Agnieszka DĘBCZAK, Roman GIEYSZTOR, Tomasz SZYMCZAK a Edward RÓJ. Determination of fat- and water-soluble vitamins by supercritical fluid chromatography: A review. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(1), 336-350 [cit. 2022-01-27]. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700598.
- [216] Antibodies Online. Vitamin E (VE E) ELISA Kit. Available at: [http://www.antibodies-online.com/kit/366739/Vitamin + E + VE + E + ELISA/](http://www.antibodies-online.com/kit/366739/Vitamin+E+VE+E+ELISA/). Accessed 27 January, 2022.
- [217] ATLAS, Susan J. a Karoly G. PINTER. Glass-fiber paper chromatography of vitamin E. *Analytical Biochemistry* [online]. 1966, **17**(2), 258-262 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(66)90203-X.
- [218] PYKA, A a J SLIWIOK. Chromatographic separation of tocopherols. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **935**(1-2), 71-76 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)00944-X.
- [219] BEATTIE, J. Rerrwick, Ciaran MAGUIRE, Sarah GILCHRIST, et al. The use of Raman microscopy to determine and localize vitamin E in biological samples. *The FASEB Journal* [online]. 2007, **21**(3), 766-776 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.06-7028com.
- [220] BENER, Mustafa a Reşat APAK. Novel optical sensor-based method for determining total tocopherol content in serum. *TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY* [online]. 2018, **42**(6), 1687-1694 [cit. 2022-01-27]. ISSN 13000527. Dostupné z: doi:10.3906/kim-1804-8.
- [221] LECHNER, Marion, Birgit REITER a Eberhard LORBEER. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* [online]. 1999, **857**(1-2), 231-238 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(99)00751-7.
- [222] DEMIRKAYA, Fatma a Yucel KADIOGLU. Simple GC-FID method development and validation for determination of α -tocopherol (vitamin E) in human plasma. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2007, **70**(3), 363-368 [cit. 2022-01-27]. ISSN 0165022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2006.08.006.

- [223] ZERBINATI, C., F. GALLI, R. REGOLANTI, G. POLI a L. IULIANO. Gas chromatography–mass spectrometry microanalysis of alpha- and gamma-tocopherol in plasma and whole blood. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2015, **446**, 156-162 [cit. 2022-01-27]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2015.04.026.
- [224] RUBIÓ, Laura, Silvia YUSTE, Iziar LUDWIG, et al. Application of Dried Blood Spot Cards combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine eight fat-soluble micronutrients in human blood. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, **1152** [cit. 2022-01-27]. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2020.122247.
- [225] NAVALE, Archana Mohit, Vichika R. PATEL a Falguni B. TANDEL. Chromatographic method for estimation of vitamin E from dried blood spot sample. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2020, **6**(1) [cit. 2022-01-27]. ISSN 2314-7253. Dostupné z: doi:10.1186/s43094-020-00025-1.

PŘÍLOHY

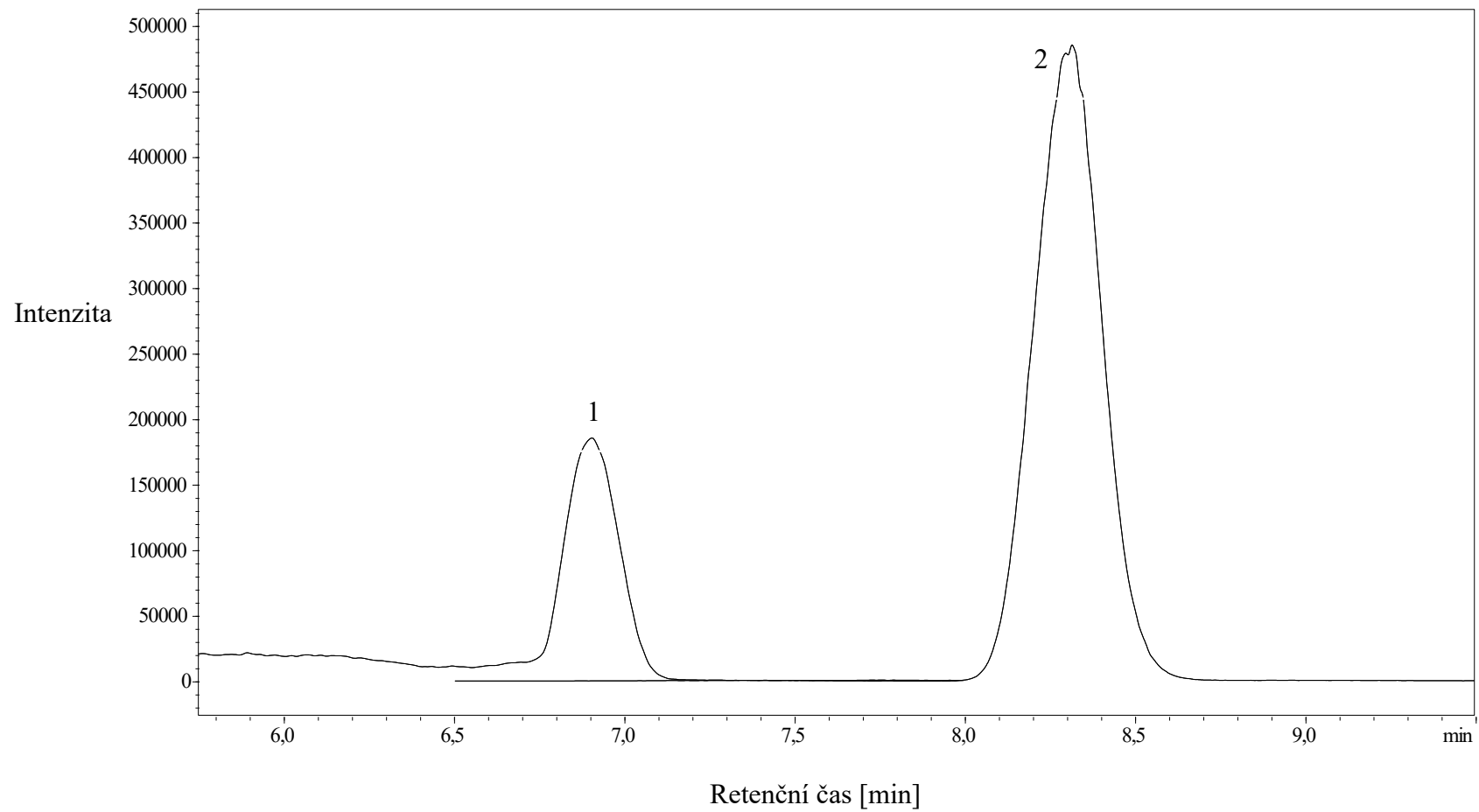
Příloha 1: Chromatografický záznam stanovení standardu S ₅ α -tokoferolu (10,48 $\mu\text{mol/l}$) a α -tokoferolacetátu (0,1 $\mu\text{mol/l}$) v krvi získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS.....	103
Příloha 2: Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu v krvi dobrovolného dárce získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS (HPLC podmínky viz příloha 1).....	104
Příloha 3: Koncentrace α -tokoferolu v krvi dobrovolných dárců získaných technikou suché kapky krve	105



Příloha 1: Chromatografický záznam stanovení standardu S₅ α -tokoferolu (10,48 $\mu\text{mol/l}$) a α -tokoferolacetátu (0,1 $\mu\text{mol/l}$) v krvi získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS

Píky: 1: α -tokoferol, 2: IS α -tokoferolacetát.

HPLC podmínky: mobilní fáze byla směs acetonitrilu a deionizované vody v poměru 83:17 (v/v) s obsahem 0,1% kyseliny mravenčí, průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min, dávkovaný objem vzorku 5 μl , celkový čas analýzy byl 20 min, isokratická eluce, byla použita kolona Discovery[®] HS F5 (150 \times 2,1 mm; 3 μm), opatřena ochrannou kolonou Discovery[®] HS F5 (4 \times 2,1 mm; 3 μm)



Příloha 2: Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu v krvi dobrovolného dárce získané technikou suché kapky metodou HPLC-MS/MS (HPLC podmínky viz příloha 1)

Píky: 1: α -tokoferol, 2: IS α -tokoferolacetát.

Příloha 3: Koncentrace α -tokoferolu v krvi dobrovolných dárců získaných technikou suché kapky krve

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)
1	Ž	32	1,04
5	Ž	59	1,23
7	Ž	36	1,15
8	Ž	58	1,67
9	M	60	1,87
10	M	34	1,22
13	Ž	29	1,35
15	Ž	27	1,02
17	Ž	29	1,12
19	M	27	1,13
20	M	31	1,28
25	Ž	28	1,30
28	M	35	1,52
29	M	31	1,15
33	Ž	47	1,35
35	M	30	1,26
36	Ž	46	1,31
37	M	18	1,09
41	M	46	1,15
42	Ž	58	1,52
44	M	40	1,06
45	M	61	1,10
46	Ž	49	0,95
49	M	58	1,09
54	M	67	1,43
55	M	60	1,04
56	Ž	25	1,17
57	Ž	36	1,26
58	Ž	44	1,11
59	Ž	45	1,22