

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Petra Kubitová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení α -tokoferolu v krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra Kubitová**
Osobní číslo: **C23231**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Stanovení α -tokoferolu v krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí**
Téma práce anglicky: **Determination of α -tocopherol in Blood Obtained by the Dried Spot Technique by the Method of Gas Chromatography with Mass Detection**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část: Metody stanovení hladiny α -tokoferolu v lidské plazmě a krvi. Technika suché kapky krve. Parametry ovlivňující kvantitativní výsledky.

Experimentální část: Technika suché kapky krve, vliv hodnoty hematokritu na hladinu α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve. Příprava vzorku před vlastní analýzou. Analytické parametry metody.

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

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení α -tokoferolu v krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí 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 07. 05. 2025

Bc. Petra Kubitová

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych ráda poděkovala vedoucímu práce prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za odborné vedení při práci, cenné rady, korekturu textu, věnovaný čas a za trpělivost při vypracování mé diplomové práce. Velké poděkování patří také paní laborantce Šefčíkové, za pomoc při práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat odběrovému centru MeDiLa spol. s.r.o. za poskytnutí služeb při odběru krve.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá stanovením α -tokoferolu v kapilární krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí a optimalizací postupu přípravy vzorku. Teoretická část práce shrnuje chemické vlastnosti α -tokoferolu, jeho význam v lidském organismu a dostupné metody jeho stanovení v různých biologických matricích. Podrobně se věnuje principům techniky suché kapky krve, včetně faktorů, které mohou ovlivnit výsledky analýzy. Pozornost je rovněž věnována možnostem extrakce a úpravě vzorků pro účely plynové chromatografie. Praktická část je zaměřena na optimalizaci podmínek postupu přípravy vzorků suché kapky krve a následnou analýzu α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

KLÍČOVÁ SLOVA

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

TITLE

Determination of α -tocopherol in blood obtained by the dried spot technique by the method of gas chromatography with mass detection

ANNOTATION

This thesis deals with the determination of α -tocopherol in capillary blood obtained by the dried blood spot technique using gas chromatography with mass detection and optimization of the sample preparation procedure. The theoretical part of the thesis summarizes the chemical properties of α -tocopherol, its importance in the human body and the available methods for its determination in various biological matrices. The principles of the dried blood spot technique are discussed in detail, including factors that may affect the results of the analysis. Attention is also given to the possibilities of extraction and sample preparation for gas chromatography. The practical part is focused on optimizing the conditions of the dried blood spot samples preparation procedure and the subsequent analysis of α -tocopherol by gas chromatography method with mass detection.

KEYWORDS

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

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK, ROVNIC A GRAFŮ	13
SEZNAM ZKRATEK.....	15
ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 α -Tokoferol	18
1.1.1 Chemická struktura	18
1.1.2 Vlastnosti a význam α -tokoferolu v lidském organismu	19
1.2 Technika suché kapky krve.....	20
1.2.1 Odběr vzorku suché kapky krve.....	20
1.2.2 Skladování a transport vzorku suché kapky krve.....	21
1.2.3 Odběrové karty pro techniku suché kapky krve.....	21
1.2.4 Faktory ovlivňující kvantitativní výsledky	22
1.2.4.1 Množství aplikované krve na odběrovou kartu, pozice krevní skvrny, ze které je disk vyražen.....	22
1.2.4.2 Vliv hodnoty hematokritu.....	23
1.2.4.3 Extrakce analytů ze vzorků suché kapky krve	23
1.2.5 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve	24
1.2.6 Použití techniky suché kapky krve v klinické praxi	25
1.2.6.1 Novorozenecký screening.....	25
1.2.6.2 Sérodiagnostika.....	26

1.3.	Stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích.....	27
1.3.1	Úprava vzorku před vlastní analýzou.....	27
1.3.1.1	Precipitace proteinů při přípravě vzorků.....	27
1.3.1.2	Použití saponifikace při přípravě vzorků	28
1.3.1.3	Použití antioxidantů pro stabilizaci tokoferolů při přípravě vzorků	28
1.3.1.4	Použití vnitřního standardu při analýze tokoferolů.....	28
1.3.1.5	Extrakce na pevné fázi.....	29
1.3.1.6	Extrakce kapalina–kapalina	30
1.3.2	Metody stanovení α -tokoferolu.....	30
1.3.2.1	Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie	30
1.3.2.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	31
1.3.2.3	Tenkvrstvá chromatografie	31
1.3.2.4	Enzymová imunoanalýza.....	31
	CÍL PRÁCE	32
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
2.1	Chemikálie	33
2.2	Přístroje a pomůcky	33
2.3	Pracovní roztoky	34
2.4	Odběr venózní krve pro optimalizaci přípravy vzorků suché kapky krve a validaci metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	36
2.5	Příprava kalibračních standardů α -tokoferolu.....	36

2.6	Příprava kalibračních standardů v biologické matrici (venózní krvi).....	36
2.7	Příprava vzorků pro optimalizaci metody a stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve.....	37
2.7.1	Přesnost v sérii a mezi sériemi.....	37
2.7.2	Výtěžnost metody	37
2.7.3	Hodnocení vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky	37
2.7.3.1	Vliv hematokritu	38
2.7.3.2	Vliv objemu aplikované krve na filtrační papír	38
2.7.3.3	Vliv homogenity krevní skvrny na kvantitativní výsledky.....	38
2.7.4	Volba vnitřního standardu.....	39
2.8	Postup zpracování vzorků suché kapky krve.....	39
2.9	Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve.....	39
2.10	Podmínky plynové chromatografie.....	41
2.11	Vyhodnocení a zpracování výsledků	41
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	42
3.1	Analytické parametry metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve.	42
3.1.1	Přesnost v sérii a mezi sériemi.....	42
3.1.2	Výtěžnost metody	43
3.2	Vliv vybraných parametrů na kvantitativní výsledky	44
3.2.1	Vliv hematokritu a objemu pipetované krve na kvantitativní výsledky	44

3.2.2	Vliv homogenity suché kapky krve na koncentraci α -tokoferolu.....	48
3.3	Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve.....	49
3.3.1	Linearita metody	49
3.3.2	Mez detekce a stanovitelnosti	50
	ZÁVĚR	51
	POUŽITÁ LITERATURA	52
	SEZNAM PŘÍLOH	67

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK, ROVNIC A GRAFŮ

Obrázek 1 Strukturní vzorec α -tokoferolu.....	18
Obrázek 2 Vzorky suché kapky krve. (A) Vrstvená skvrna, (B) změna barvy v důsledku hemolýzy nebo vlhkosti, (C) nedokonalý kruhový tvar, (D) krevní skvrna dobré kvality, splňující požadavky pro analýzu [21].....	21
Obrázek 3 Vztah mezi pipetovaným objemem krve na odběrovou kartu a průměrem vzorku suché kapky krve (upraveno) [11]	23
Tabulka 1 Předpoklady pro provádění celoplošného screeningu (upraveno) [42]	26
Tabulka 2 Organická rozpouštědla používaná k precipitaci bílkovin při stanovení tokoferolů	27
Tabulka 3 Příprava jednotlivých kalibračních standardů α -tokoferolu	36
Tabulka 4 Příprava vzorků krve s různou hodnotou hematokritu	38
Tabulka 5 Přesnost metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	43
Tabulka 6 Výtěžnost metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	44
Tabulka 7 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu krve na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve	45
Tabulka 8 Vliv homogenity na koncentraci α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve.....	48
Tabulka 9 Plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 kalibračních standardů připravených v plné krvi	49

Rovnice 1 Výpočet směrodatné odchylky (AVG, aritmetický průměr; x_i , naměřená koncentrace analytu ve vzorku; n, počet vzorků (měření) v sérii)	40
Rovnice 2 Výpočet variačního koeficientu (CV, variační koeficient; SD, směrodatná odchylka; AVG, aritmetický průměr).....	40
Graf 1 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve.....	45
Graf 2 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve.....	46
Graf 3 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve.....	47
Graf 4 Stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve, kalibrační křivka.....	50

SEZNAM ZKRATEK

BHT	butylhydroxytoluen
CEC	kapilární elektrochromatografie (z angl. capillary electrochromatography)
CV	variační koeficient (z angl. the coefficient of variation)
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
EIA	enzymová imunoanalýza (z angl. enzyme immuno assay)
FLD	fluorescenční detektor
FTA	technologická společnost Flinders (z angl. Flinders Technology Association)
GC	plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
GC–MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (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)
IS	vnitřní standard (z angl. internal standard)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (z angl. low-density lipoproteins)
LLE	extrakce kapalina–kapalina (z angl. liquid-liquid extraction)
LOD	mez detekce (z angl. limit of detection)

LOQ	mez stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
PFSPE	extrakce tuhrou fází s použitím nanovláken (z angl. packed fibre solid-phase extraction)
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. reversed phase high-performance liquid chromatography)
SD	směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
SFE	extrakce superkritickou tekutinou (z angl. supercritical fluid extraction)
SPE	extrakce na pevné fázi (z angl. solid phase extraction)
TDM	monitorování hladin léků (z angl. therapeutic drug monitoring)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (z angl. thin layer chromatography)
UV	ultrafialová oblast (z angl. ultraviolet)
Vis	viditelná oblast (z angl. visible)

ÚVOD

Vitamin E, především jeho nejaktivnější forma α -tokoferol, je velice důležitou sloučeninou s významnými antioxidačními vlastnostmi. Jeho úlohou je ochrana buněčných struktur před účinky oxidačního stresu, a to z něj činí klíčový faktor při prevenci mnoha chronických onemocnění, včetně kardiovaskulárních a neurodegenerativních chorob. Měření hladiny α -tokoferolu v biologických vzorcích tak nabývá na důležitosti jak v klinické praxi, tak v rámci výzkumu nutričního stavu populace.

V posledních letech se stále více uplatňuje technika odběru suché kapky krve (DBS, dried blood spot), která nabízí méně invazivní a logisticky výhodnější variantu, oproti klasickému odběru venózní krve. Tato technika umožňuje provedení odběru v domácím prostředí, nevyžaduje zvláštní podmínky pro transport a spotřebuje jen minimální množství vzorku, což je žádoucí zejména u novorozenců, seniorů a chronicky nemocných pacientů. Kombinace DBS s moderními analytickými technikami přináší nový potenciál pro rychlou a efektivní diagnostiku i monitorování zdravotního stavu.

Přes mnoho výhod techniky DBS je však nutné poukázat i na faktory, které mohou ovlivnit správnost výsledků, jako je například hodnota hematokritu, distribuce analytu v matrici nebo podmínky skladování vzorku. Proto je před stanovením α -tokoferolu nezbytné optimalizovat podmínky tak, aby se minimalizoval jejich vliv. Moderní separační techniky, jako je plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC–MS, z angl. gas chromatography-mass spectrometry), poskytují vysokou citlivost a selektivitu potřebnou pro kvantifikaci této látky ve vzorku DBS.

Cílem této diplomové práce je zhodnotit možnosti stanovení α -tokoferolu v krvi získané technikou DBS s využitím metody GC–MS, a tím přispět k rozvoji neinvazivních a dostupných nástrojů pro sledování nutričního stavu a antioxidačních vlastností organismu.

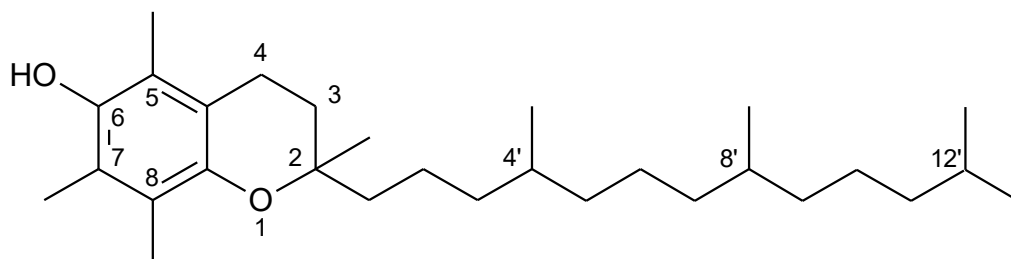
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 α -Tokoferol

O objevení α -tokoferolu se zasloužil americký endokrinolog Herbert McLean Evans spolu se svou kolegyní Katherine S. Bishop z Kalifornské univerzity při sledování vlivu stravy na reprodukci laboratorních krys [1, 2]. Ve své studii zjistili, že krysy krmené dietou postrádající určité tuky trpí neplodností. Tento stav bylo možné zvrátit, pokud do jejich stravy přidali olej z pšeničných klíčků. Tento významný objev vedl k identifikaci nové klíčové látky potřebné pro reprodukci, později známé jako vitamin E, konkrétně α -tokoferol [2, 3].

1.1.1 Chemická struktura

α -Tokoferol je jedním z osmi isomerů vitamínu E. Strukturní analýzy odhalily existenci dalších forem vitamínu E: tři další tokoferoly (β , γ a δ) a čtyři tokotrienoly (α , β , γ a δ) [4]. Z chemického hlediska se α -tokoferol skládá z chromanového jádra s hydroxylovou skupinou na šesté pozici a hydrofobního isoprenoidního řetězce připojeného na druhé pozici. Tento řetězec má tři chirální centra v poloze 4', 8' a 12', jejichž konfigurace udává, že se jedná právě o α -tokoferol. Na 5., 7. a 8. pozici chromanového jádra jsou přítomny methylové skupiny, které významně ovlivňují biologickou aktivitu a antioxidační účinnost α -tokoferolu [2]. Sumární vzorec α -tokoferolu je $C_{29}H_{50}O_2$. Molekulová hmotnost je 430,7 g/mol. Strukturní vzorec α -tokoferolu je uveden na obrázku 1.



Obrázek 1 Strukturní vzorec α -tokoferolu

1.1.2 Vlastnosti a význam α -tokoferolu v lidském organismu

Pro α -tokoferol je typická světle žlutá barva olejového charakteru s velmi dobrou viskozitou. V olejích, tucích a vybraných organických rozpouštědlech, jako je aceton, ether, alkohol a chloroform je α -tokoferol dobře rozpustný, ve vodě je nerozpustný [5].

Antioxidační účinky a rozpustnost v tucích hrají klíčovou úlohu při ochraně buněk před oxidačním poškozením vedoucím ke vzniku chronických onemocnění, kterými mohou být kardiovaskulární choroby, některé typy rakoviny a neurodegenerativní onemocnění. Jako hlavní lipofilní antioxidant také chrání buněčné membrány, lipoproteiny a další struktury bohaté na lipidy před oxidačním stresem způsobeným volnými radikály [2].

V krevní plazmě je α -tokoferol transportován lipoproteinovými částicemi, především LDL (z angl. low-density lipoprotein) a HDL (z angl. high-density lipoprotein). Koncentrace je ovlivněna zejména dietou, absorpcí ze střeva, distribucí do tkání a rychlostí metabolismu a vylučování. Hladina α -tokoferolu v lidské plazmě by neměla klesnout pod 12 $\mu\text{mol/l}$ a zároveň by neměla překročit hranici 46 $\mu\text{mol/l}$ [2, 4].

α -Tokoferol můžeme získat z rostlinných olejů, zelené listové zeleniny, ořechů a semen. Zvýšený příjem má pozitivní dopad na snížení rizika kardiovaskulárních chorob nebo na správnou funkci imunitního systému [2, 4].

1.2 Technika suché kapky krve

Filtrační papír jako nástroj pro odběr a analýzu lidské krve má své počátky v 60. letech 20. století. Vzorke DBS poprvé využil Dr. Robert Guthrie k monitorování hladin fenylalaninu u novorozenců za účelem detekce fenylketonurie. Tato inovace se postupně rozšířila a vytvořila tak dobrý základ pro časnou diagnostiku mnoha dědičných metabolických poruch, především při screeningu novorozenců. Dále se metoda uplatňuje během dlouhodobého sledování dietní léčby pacientů [6–11].

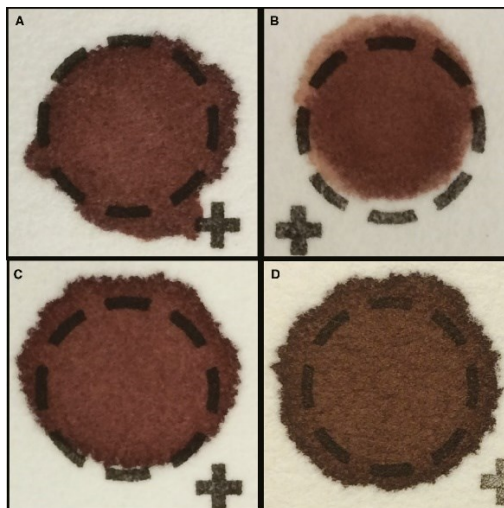
Podstatou techniky DBS je nanášení malých objemů kapilární krve na vybrané papírové karty. Ve srovnání se vzorky plazmy nebo venózní krve je výhodou snazší odběr vzorků a následné logistické aspekty, které se týkají skladování a přepravy vzorků. Během transportu není vyžadováno uchování v lednici či na suchém ledu. Z hlediska komfortu pacienta je technika DBS upřednostňována, neboť odběr krve může být proveden v domácím prostředí a vzorek odeslán do laboratoře. Na rozdíl od venepunkce se jedná o méně invazivní a méně traumatizující techniku, která vyžaduje jen malý objem krve. Z tohoto důvodu je vhodná především pro pacienty, kteří jsou monitorováni, kojence a malé děti [7, 11–13].

Techniku suché kapky lze aplikovat i na jiné biologické tekutiny, jako je plazma (DPS, z angl. dried plasma spot), moč (DUS, z angl. dried urine spot) a mateřské mléko (DBMS, z angl. dried breast milk spot) [14–17].

1.2.1 Odběr vzorku suché kapky krve

Vzorke kapilární krve mohou být odebrány z více míst na lidském těle, z ušních lalůček, paty nebo konečků prstů. U dospělých a starších dětí se preferuje odběr z distální laterální strany druhého nebo třetího konečku prstu na nedominantní ruce. U novorozenců a kojenců se výhradně používá oblast paty [6, 8]. Před odběrem je prst, nebo pata jemně masírována a zahřívána, aby se zvýšil průtok krve. Místo vpichu se očistí vhodným dezinfekčním prostředkem, např. 70% isopropylalkoholem a pro odběr vzorku krve se použije sterilní jednorázová lanceta s hrotem 2,0 mm nebo menším. Vzniklá kapka krve se nanese na filtrační papír, aniž by došlo ke vzájemnému kontaktu. Kapka krve musí zcela vyplnit předtištěný kruh na odběrové kartě. Typický vzorek DBS obsahuje přibližně 50 μ l krve [6, 8, 11, 18–20].

Krev se nechá zaschnout při pokojové teplotě minimálně po dobu 3–4 hodin. Po usušení jsou krevní skvrny nahnědlé (obrázek 2) [6, 8, 18].



Obrázek 2 Vzorky suché kapky krve. (A) Vrstvená skvrna, (B) změna barvy v důsledku hemolýzy nebo vlhkosti, (C) nedokonalý kruhový tvar, (D) krevní skvrna dobré kvality, splňující požadavky pro analýzu [21]

1.2.2 Skladování a transport vzorku suché kapky krve

Při skladování je nutné vzorky DBS chránit před vlhkostí, a proto jsou před uskladněním odběrové karty vloženy do sáčku se zipem obsahující vysoušedlo. Pro kontrolu do něj může být vložen rovněž indikátor vlhkosti. S ohledem na stabilitu analytů mohou být vzorky skladovány při pokojové teplotě po dobu několika týdnů či měsíců. U vzorků, které nevykazují vysokou stabilitu při pokojové teplotě, se doporučuje vzorky skladovat při nižších teplotách. Při odběru krve doma lze vzorky DBS odeslat do laboratoře běžnou poštou [18, 22].

1.2.3 Odběrové karty pro techniku suché kapky krve

Na trhu jsou pro odběr krevních skvrn k dispozici papíry na bázi celulosy (chemicky upravené i neupravené) a papíry na necelulosové bázi. Nejčastěji se používají papíry z vysoce čisté bavlny, které jsou navrženy tak, aby poskytovaly ideální absorpci vzorků krve [6, 11]. Odběrové karty se volí na základě vlastností analytu, jeho stability, účincích extrakce a v neposlední řadě na metodě analýzy. Pro novorozenecký screening jsou oblíbené odběrové karty Whatman 903, vyrobené ze 100% čisté bavlny bez přidaných přísad. Dalším typem odběrových karet vyráběných z bavlny a bez impregnace jsou Ahlstrom 226 a Munktell TFN.

Odběrové karty na bázi celulosy FTA (Flinders Technology Associates) a FTA Elute jsou určeny pro analýzu nukleových kyselin. Odběrové karty jsou ošetřeny patentovanými činidly (např. dodecylsulfát sodný, guanidiumthiokyanát), které při kontaktu s krví zajišťují lýzu buněk, denaturují bílkoviny a zabraňují růstu bakterií a jiných mikroorganismů. Impregnace chemikáliemi také usnadňuje stabilizaci biologicky aktivních molekul ve vzorku. Tyto odběrové karty se používají především ve farmaceutickém průmyslu [11, 14, 23–25]. Odběrové karty na necelulosové bázi zajišťují homogenní rozptýlení krve nezávislé na hodnotě hematokritu. Komerčně dostupné jsou také odběrové karty vyrobené ze skelných mikrovláken, ty však nejsou primárně navrženy pro odběr vzorků technikou DBS [11].

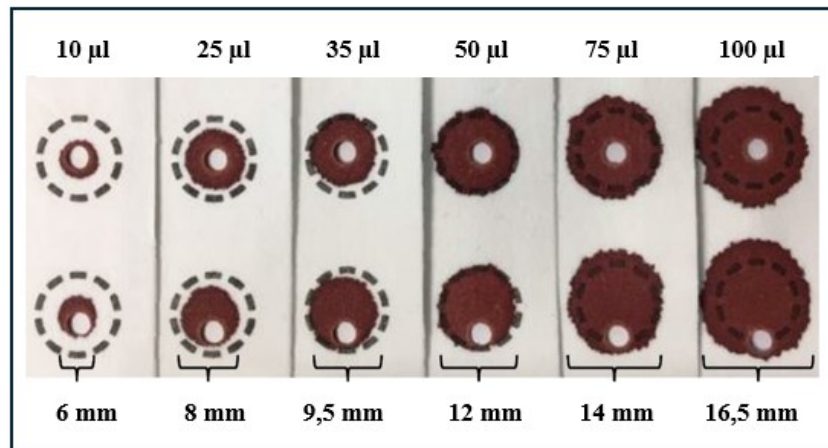
1.2.4 Faktory ovlivňující kvantitativní výsledky

Prvním krokem při přípravě vzorku DBS je vyrazení disku o definovaném průměru, nejčastěji ze středu. Průměr vyraženého disku by měl v ideálním případě odpovídat danému objemu kapalně krve. Nicméně tomu tak nebývá, hovoříme pak o parametrech ovlivňující kvantitativní výsledky, jimiž jsou především velikost objemu krve nanášeného na odběrovou kartu, vliv hodnoty hematokritu a distribuce analytu mezi erythrocyty a plazmou [11].

U vzorků DBS určených pro novorozenecký screening se nejčastěji vyráží disk o průměru 3,2 mm [11]. Při vyrázení disků poloautomatickými a automatizovanými systémy může dojít k přenosu vzorku. To hrozí zejména, když je analyzován vzorek DBS, jemuž předcházela vzorek DBS s vysokou koncentrací stanovovaného analytu (například kalibrátor s nejvyšší koncentrací nebo vzorek kontroly kvality s nejvyšší koncentrací). Proto je nutné při validaci metody ověřit přenos vzorku mezi jednotlivými analýzami [11, 26, 27].

1.2.4.1 Množství aplikované krve na odběrovou kartu, pozice krevní skvrny, ze které je disk vyražen

Při nanesení kapky krve na odběrovou kartu dochází k chromatografickému účinku, plazma je soustředěna uvnitř vláken papíru, zatímco erythrocyty jsou koncentrovány na okraji krevní skvrny. To vede k tomu, že analyty, které jsou distribuovány v erythrocytech mají v disku vyraženém na periferii vyšší koncentraci než v disku vyraženém ze středu [11, 19, 28–30]. Na obrázku 3 jsou ukázány vzorky DBS připravené pipetováním různého objemu krve. Velikost vyražených disků je 3,2 mm.



Obrázek 3 Vztah mezi pipetovaným objemem krve na odběrovou kartu a průměrem vzorku suché kapky krve (upraveno) [11]

1.2.4.2 Vliv hodnoty hematokritu

Referenční hodnota hematokritu je u člověka mezi 28–67 %, závisí na věku, pohlaví a zdravotním stavu. Hodnota hematokritu je považována za klíčový faktor ovlivňující kvantitativní výsledky, souvisí s dobou sušení krve, homogenitou vzorku DBS a účinností extrakce analytu. Vzorky s vyšší hodnotou hematokritu jsou viskóznější, což ovlivňuje rozložení erytrocytů a plazmy na filtračním papíru [11, 25, 27, 31].

V současné době není k dispozici validní test pro kvantifikaci hematokritu přímo ve vzorku DBS. Vliv hematokritu lze obejít tak, že je analyzován celý vzorek DBS, ovšem účinnost extrakce analytu tím neovlivníme [11, 25, 27, 32].

1.2.4.3 Extrakce analytů ze vzorků suché kapky krve

Analyty ze vzorku DBS lze extrahovat různými způsoby. Pro extrakci analytů ze vzorku DBS je obvykle používána směs vody a organických rozpouštědel [11].

Pro kvantifikaci analytu ve vzorcích získaných metodou DBS se využívá vnitřní standard (IS, z angl. internal standard). Ten se přidává v konstantním množství a ve stejné koncentraci ke všem vzorkům, včetně slepých vzorků a kalibračních standardů. V praxi se u techniky DBS běžně přidává IS do extrakčního rozpouštědla [11, 33].

1.2.5 Výhody a nevýhody techniky suché kapky krve

Technika DBS se v posledních letech stala široce využívanou u dětí při terapeutickém monitorování hladin léků (TDM, z angl. therapeutic drug monitoring), a to díky svým prokázaným výhodám oproti konvenčnímu odběru a analýze vzorků krve či plazmy. Vzhledem k dobré absorpci a pevné struktuře DBS nejsou analyty příliš reaktivní v porovnání s jejich chováním v kapalně krvi. Jednou z hlavních výhod je komfort při odběru, který díky své jednoduchosti mohou provádět i pacienti bez asistence lékaře. Ocení to zejména ambulantní pacienti, pro něž je časté docházení na odběry krve časově i finančně náročné. Pokud je při sledování analytů, jejichž hladiny jsou variabilní, zapotřebí odběr krve každý den, lze využít techniku DBS a provést odběr krve v domácím prostředí. U některých pacientů je také nezbytné opakování odběru během dne v různých časových intervalech, což je při domácím odběru taktéž umožněno. Při porovnání s odběrem venózní krve je u odběru technikou DBS vyžadován několikanásobně nižší objem odebrané krve. Tato technika je tak vhodná pro pacienty, u nichž není možné odebírat větší objem krve. Jedná se o novorozence, kojence a kriticky nemocné pacienty. V preklinických studiích lze snížit počet pokusných zvířat, zejména těch malých, jako jsou myši [7, 34–37].

Z logistického hlediska je použití techniky DBS výhodné. Snadnější transport do laboratoře umožňuje provádět odběry i na odlehlých místech. Vzorky uchované v uzavřených obalech s proměnnou teplotou vykazují stabilitu i po dobu několika dnů. Pro doručení vzorků do laboratoře je tedy možné využít běžných kurýrních služeb. Tím se snižují náklady na přepravu a eliminují se možné chyby s ní spojené [7, 36, 37].

K velké řadě výhod se pojí i nevýhody, které je potřeba zohlednit. Jednou z nich je možné ekonomické zatížení spojené s ověřováním testů (např. porovnáváním s testy založenými na venepunkci). Analýza analytů ve vzorcích s malým objemem krve může být obtížná a s nereprodukovatelnými výsledky. Referenční hodnoty celé řady biologicky významných látek jsou určeny pro vzorky séra či plazmy, proto je nutné koncentrace získané z krve technikou DBS přepočítat vhodným korekčním faktorem. Nevýhodou je rovněž různá stabilita stanovovaných analytů, některé mohou být za daných podmínek skladování degradovány. Dalším možným rizikem techniky DBS je kontaminace, k té může dojít buď při samotném odběru vzorků krve nebo použitým odběrovým materiálem. Delší doba schnutí, která

se odvíjí od typu odběrové karty a objemu nanesené krve, je dalším nežádoucím aspektem. Během schnutí může docházet ke koagulaci či lýze krve [25, 34, 38, 39].

Velkou nevýhodou techniky DBS je vliv hematokritu. Hodnota hematokritu ovlivňuje viskozitu krve a tím její šíření po filtračním papíře. Hodnota hematokritu se může lišit u jednotlivých etnik, v různých stupních těhotenství, vliv má i nadmořská výška. Tyto faktory je potřeba zohlednit při vyhodnocování výsledků [34, 40].

1.2.6 Použití techniky suché kapky krve v klinické praxi

Technika DBS je nejčastěji aplikována v rámci novorozeneckého screeningu. Dále je využívána u preklinických a klinických farmakokinetických studií, TDM, toxikokinetiky a forenzních věd. Jediná krevní skvrna umožňuje identifikaci celé řady analytů, zejména proteinů, jenž charakterizují stav reprodukčního, endokrinního, kardiovaskulárního a imunitního systému [14, 36, 41].

1.2.6.1 Novorozenecký screening

Při novorozeneckém screeningu jsou efektivním způsobem odhalovány vrozené poruchy metabolismu. Cílem je diagnostikovat, monitorovat a zahájit léčbu ještě předtím, než dojde ke klinickému projevu metabolických, hematologických, endokrinních a dalších genetických onemocnění, která způsobí dítěti trvalé poškození zdraví. V širším smyslu zahrnuje novorozenecký screening nejen laboratorní testy, ale také klinická vyšetření prováděná pediatry, zaměřená na odhalování vrozených vad orgánů nebo infekcí. Jedním z nezbytných vyšetření je kontrola kyčlí, zda dítě nemá dysplazii. Dále sem patří vyšetření u oftalmologa k detekci vrozeného očního zákalu, screening sluchu pro odhalení vrozené hluchoty, ale i ultrazvukové vyšetření ledvin, které pomáhá identifikovat vrozené vady ledvin [36, 42–44].

Z laboratorního hlediska je při novorozeneckém screeningu stanovena koncentrace specifické látky ve vzorku DBS metodou hmotnostní spektrometrie. Odběr krve je prováděn z patičky novorozence pod dohledem kvalifikované osoby. Za analýzu, interpretaci nálezů a následující patřičné kroky ve prospěch novorozence zodpovídá screeningová laboratoř. Dané vyšetření probíhá u všech novorozenců na území státu [42, 45].

Celoplošný screening byl prvně realizován v roce 1968 po ustanovení obecných pravidel pro jeho provádění [42]. V tabulce 1 jsou uvedeny předpoklady pro jeho provádění.

Tabulka 1 Předpoklady pro provádění celoplošného screeningu (upraveno) [42]

Vyšetřovaná choroba musí být jasně definována, tj. diagnostikovatelná.
Choroba představuje významný zdravotně sociální problém.
Choroba je častá, má v dané populaci určitou incidenci. Hranice incidence je však relativní a je ovlivněna především faktory ekonomickými. Ve vyspělých zemích lze v současné době spatřovat tuto hranici v incidenci 1:50 000–1:100 000.
Zachycení choroby v jejím časném, presymptomatickém stadiu umožňuje taková léčebná opatření, která zásadním způsobem pozitivně ovlivní průběh choroby či dokonce sníží úmrtnost na ni. Léčebná opatření musí být běžně dostupná a zajistitelná pro všechny zachycené jedince.
Existuje obecně uznaný screeningový test, tj. choroba je v preklinickém stadiu detekovatelná obecně uznaným laboratorním testem ve vzorku suché kapky krve s obecně přijatou hranicí negativity a obecně akceptovatelnou zátěží zdravé populace.
Společnost je schopna zajistit provádění laboratorního testu u všech novorozenců jak po stránce organizační, tak ekonomické.
Efektivita a účinnost novorozeneckého screeningu je předmětem průběžného vyhodnocování.

Od 1. 6. 2016 je u novorozenců v České republice technikou DBS vyšetřováno 18 onemocnění, mezi nimiž jsou například vrozená hypofunkce štítné žlázy, vrozená nedostatečná tvorba hormonů nadledvin a dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin a mastných kyselin [42].

1.2.6.2 Sérodiagnostika

Technika DBS může být použita k detekci protilátek jako ukazatelů infekčních onemocnění, kterými jsou hepatitida, zarděnky, spalničky, tetanus, leptospiróza, brucelóza či leishmanióza. Technika DBS se rovněž osvědčila jako finančně výhodný a efektivní nástroj pro sledování infekce HIV. V neposlední řadě je technika DBS využita k diagnostice potravinových intolerancí [36, 46–50].

1.3. Stanovení α -tokoferolu v biologických vzorcích

Tokoferoly jsou přítomny v různých biologických vzorcích jako jsou plazma, sérum, moč, tkáň, krvinky, seminální plazma, plodová voda, stolice, mateřské mléko, kolostrum a mozkomíšni mok [51–54]. Postup přípravy vzorku je nutné zvolit s ohledem na koncentraci vybraných tokoferolů v biologických matricích. Příprava vzorku má vliv na celkovou dobu analýzy a náklady s ní spojené [51].

1.3.1 Úprava vzorku před vlastní analýzou

Vzhledem ke své lipofilní povaze jsou tokoferoly vázány na různé struktury, jako jsou buněčné membrány a lipoproteiny. Tato skutečnost znemožňuje přímé dávkování vzorku do analytického systému, aniž by došlo k jeho předchozí úpravě, kterou je precipitace proteinů a extrakce [51, 55].

1.3.1.1 Precipitace proteinů při přípravě vzorků

Uvolnění tokoferolů z makromolekul je běžně prováděno precipitací, kdy je k biologické matrici přidáno organické rozpouštědlo. Tento krok se provádí před nebo současně s procesem saponifikace nebo extrakce. Pro účinnou precipitaci proteinů a uvolnění tokoferolů musí být dodržen vhodný objemový poměr vzorku k organickému rozpouštědlu [51, 55]. Jednotlivá organická rozpouštědla používaná pro precipitaci proteinů při stanovení tokoferolů a vhodné poměry objemu vzorku k objemu organického rozpouštědla jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Organická rozpouštědla používaná k precipitaci bílkovin při stanovení tokoferolů

Organické rozpouštědlo	Objemový poměr (v/v)	Zdroj
methanol	1:1	[52]
ethanol	1:2	[55]
butanol	1:4	[56]
acetonitril	1:5	[56]

Relativně vysoká polarita výše uvedených rozpouštědel může způsobit společnou precipitaci tokoferolů s proteiny, a tak jejich nižší výtěžnost [51]. Šetrnější variantou je použití směsi ethylacetátu s ethanolem [57, 58], ethylacetátu [59], hexanu [60], tetrahydrofuranu [61], butanolu [62] nebo směsi butanolu s ethylacetátem [63]. Zvýšit účinnost precipitace lze

za použití nízkých teplot (4 °C), ledové lázně, intenzivního třepání, sonikace a vícenásobného opakování [51, 56, 64, 65].

1.3.1.2 Použití saponifikace při přípravě vzorků

Dalším krokem, který následuje po precipitaci proteinů je saponifikace, známá také jako zmýdelnění. Ta slouží k extrakci vitaminů rozpustných v tucích z vícesložkové matrice, jako je plodová voda, mateřské mléko, erytrocyty nebo trombocyty. Úkolem saponifikace je odstranění neutrálních lipidů saponifikačním rozpouštědlem, nejčastěji hydroxidem draselným (2 mol/l nebo 10 mol/l). Celý proces trvá přibližně 30 min při teplotě od 60 °C do 80 °C v ethanolu nebo methanolu [51, 55]. Po saponifikaci jsou složky, které jí nepodléhají, extrahovány do organického rozpouštědla, zatímco glyceroly, soli mastných kyselin a další interferující látky setrvávají v alkalické vodné fázi [55].

Při analýze tokoferolů ve vzorcích séra nebo plazmy není saponifikace nutná. Při analýze tokoferolů ve vzorcích mateřského mléka je při použití saponifikace dosaženo až o 30 % vyšší výtěžnosti [51].

1.3.1.3 Použití antioxidantů pro stabilizaci tokoferolů při přípravě vzorků

Přidání antioxidantů ke vzorku zabraňuje možné oxidaci tokoferolů ve fázi předúpravy vzorku. Použití antioxidantů není nezbytné, ale doporučuje se je použít při analýze labilních sloučenin, speciálních matric nebo pokud je součástí úpravy vzorku saponifikace. Nejčastěji používanými antioxidanty je roztok kyseliny askorbové v alkoholu nebo vodě, butylhydroxytoluen (BHT) a pyrogallol. Za běžných okolností se používá pouze jedna ze zmíněných sloučenin, existují však výjimky, například pro extrakci tokoferolů z erytrocytů, kdy je použita kombinace všech antioxidantů. Pro extrakci z mozkomíšního moku nebo plazmy byla použita kyselina askorbová ve spojení s BHT [51, 52, 55, 68, 69].

1.3.1.4 Použití vnitřního standardu při analýze tokoferolů

Vzhledem ke složité extrakci tokoferolů z biologického materiálu se doporučuje použití IS. Přidání IS by mělo kompenzovat změny v dávkovaném objemu činidel a minimalizovat ztráty analytu během preanalytické fáze. Běžně používanými IS jsou tokol (syntetický hydrochinon s nasyceným postranním řetězcem), tokoferolacetát a retinylacetát. Nejčastěji používaným IS

je tokol. Dalším běžně používaným IS je tokoferolacetát, který je vysoce stabilní vůči oxidaci [51, 55, 70].

1.3.1.5 Extrakce na pevné fázi

Krokem, který následuje po předúpravě vzorků, je extrakce. Extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. solid phase extraction) vyžaduje zručnost, je časově i finančně náročná. Odpaření organického rozpouštědla pro zkoncentrování tokoferolů ve vzorku zvyšuje riziko jejich ztráty. Výhodou je možnost automatizace a miniaturizace a je k dispozici široká škála možností, jak techniku SPE provádět. Tyto inovace zkracují dobu extrakce, pro analýzu je dostačující pouze malé množství biologického materiálu a rozpouštědla [51, 71, 72].

V závislosti na matrici vzorku se využívají různé druhy stacionárních fází, mezi které se mimo jiné řadí silikagelové patrony, hrubozrnná křemelina, C₈, C₄ a nejvíce účinnou a zároveň nejoblíbenější pro analýzu vitaminů rozpustných v tucích je C₁₈. Rozdílné typy matric ovlivňují objem dávkovaného vzorku na kolonu (0,25–1,00 ml séra a 0,5 ml erytrocytů). Elučními činidly jsou nejčastěji hexan, isopropanol a methanol. Po odpaření organického rozpouštědla je odparek rozpuštěn v alkoholu [51, 55, 56, 64, 73–75].

Extrakce na pevné fázi s použitím nanovláken (PFSPE, z angl. packed fibre solid-phase extraction) je novější vysoce výkonná technika, která byla představena v roce 2010 Liu a kol. Tato studie měla za cíl zjistit použitelnost PFSPE pro analýzu retinolu a α -tokoferolu v plazmě. Sorbentem jsou různé nanomateriály, avšak ve zmíněné studii byl použit kopolymer styrenu a methakrylové kyseliny. Popsaná technika oproti konvenční SPE zkrátila dobu analýzy, eliminovala množství dusíku potřebného k odpaření organického rozpouštědla a ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC, z angl. high-performance liquid chromatography) poskytla výtěžnost nad 90 % [51, 71].

Inovativní technologií s potenciálem do budoucna je extrakce superkritickou tekutinou (SFE, z angl. supercritical fluid extraction), jejíž použití je v souladu s ochranou životního prostředí, neboť je použito jen malé nebo žádné množství nebezpečných organických rozpouštědel [51, 55, 76, 77].

1.3.1.6 Extrakce kapalina–kapalina

Extrakce kapalina–kapalina (LLE, z angl. liquid-liquid extraction) je relativně jednoduchá, ale časově náročná technika. Technika LLE vyžaduje velké množství organických rozpouštědel. Z tohoto důvodu je vhodná miniaturizovaná LLE, při které je obvykle použito 100 až 200 μ l organického rozpouštědla [51, 67, 78, 79].

Tokoferoly lze technikou LLE extrahovat ze vzorků plazmy, krevních buněk, moči, seminální plazmy, plodové vody, mozkomíšního moku, stolice, mateřského mléka a tkáně. K extrakci je téměř výhradně používán hexan v objemu 0,5–2,0 ml. Některé postupy používají hexan s malým přírůvkem ethanolu, dichlormethanu nebo ethylacetátu. Hexan je poté odpařen proudem dusíku nebo ve vakuu. Odpaření organického rozpouštědla může probíhat při různých teplotách po dobu přibližně 20 minut nebo dokud není zcela vysušen. Odparek je rozpuštěn v alkoholu nebo mobilní fázi [51, 55, 78–81].

1.3.2 Metody stanovení α -tokoferolu

Tokoferoly v plazmě či séru jsou běžně stanovovány chromatografickými metodami. Nejčastěji je používána metoda HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC–MS, z angl. mass spectrometry), UV-Vis a fluorescenční (FLD) detekcí nebo GC–MS. Dalšími možnými metodami jsou tenkovrstvá chromatografie (TLC, z angl. thin layer chromatography), enzymová imunoanalýza (EIA, z angl. enzyme immuno assay) a kapilární elektrochromatografie (CEC, z angl. capillary electrochromatography). Metody GC–MS a CEC nemají v klinické praxi příliš vysoké uplatnění z důvodu časové náročnosti a nutnosti derivatizace tokoferolů u metody GC–MS a velké množství vzorku u metody CEC [85–87].

1.3.2.1 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie

Pro analýzu α -tokoferolu metodou GC je obvykle nutná saponifikace za tepla a derivatizace zvyšující jeho stabilitu a těkavost. V některých studiích byla hladina α -tokoferolu v biologických vzorcích stanovena bez předchozí derivatizace [55, 88–91].

1.3.2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Hladina α -tokoferolu v biologických vzorcích je nejčastěji stanovena metodou HPLC na obrácených fázích (RP-HPLC, z angl. reversed phase high-performance liquid chromatography). Jako mobilní fáze se používá buď samotné organické rozpouštědlo nebo směs organických rozpouštědel jako acetonitril a methanol nebo methanol s přísadkou triethylaminu nebo tetrahydrofuranu [87].

Univerzálním detektorem je UV/Vis, avšak ve vybraných aplikacích není pro svou nízkou specifitu vhodný [92]. Je možné ho nahradit detektorem s diodovým polem (DAD, z angl. diode array detector), který umožňuje kontinuální získávání UV/Vis spekter [65]. Pro detekci tokoferolů lze také použít FLD, který vykazuje mnohem větší citlivost oproti UV/Vis detektoru nebo elektrochemický detektor (ED, z angl. electrochemical detector), který je také vysoce citlivý [93].

1.3.2.3 Tenkovrstvá chromatografie

Technika TLC je levnější a rychlejší než kapalinová chromatografie [94]. Při stanovení tokoferolů v erythrocytech je metoda TLC předseparačním krokem metody GC [95].

1.3.2.4 Enzymová imunoanalýza

Jednou z moderních metod sloužících ke kvantifikaci α -tokoferolu v krevní plazmě je enzymová imunoanalýza. Výhodou EIA je vysoce citlivé měření α -tokoferolu i v malém množství vzorku. V některých případech může docházet ke zkříženým reakcím. Metoda využívá specifické protilátky vázající se na α -tokoferol [96].

CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo optimalizovat přípravu vzorku DBS, zjistit vliv hodnoty hematokritu, velikosti nanášeného objemu krve na odběrovou kartu a homogenity krevní skvrny na hladinu α -tokoferolu ve vzorcích DBS, určit vybrané analytické parametry metody GC–MS a především zjistit, zda je metoda GC–MS dostatečně citlivá, a tedy vhodná pro stanovení hladiny α -tokoferolu ve vzorcích DBS.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

- α -Tokoferol-D₆ (C₂₉H₄₄D₆O₂), Mr 436,74 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- α -Tokoferolacetát (C₃₁H₅₂O₃), Mr 472,74 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
- Deionizovaná voda (H₂O), Mr 18,00; G = 0,055 μ S
- Ethanol (C₂H₆O), Mr 46,07 (Merck, Darmstadt, Německo)
- Helium 5.0 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- n-Hexan (C₆H₁₂), Mr 86,18 (Merck, Darmstadt, Německo)
- α -Tokoferol (C₂₉H₅₀O₂), Mr 430,71 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

2.2 Přístroje a pomůcky

- Automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko)
- Pipeta Multipette plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Pipeta jednokanálová Research s nastavitelným objemem (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Nástavce Combitips advanced o objemu 5 ml a 25 ml (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifuga Sorvall TC6 (Sorvall® Instruments, Newtown, CT, USA)
- Centrifuga Frontier 5706 (Ohaus®, New Jersey, USA)
- Děrovací kleště, pinzeta
- Odběrová karta Whatman 903TM (Whatman, GmbH, Dassel, Německo)
- Kádinky, odměrné válce, zkumavky, gumové zátky, filtrační papír
- Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Hlubokomrazič box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Ósaka, Japonsko)

- Odběrové zkumavky s K_3EDTA , 9 ml, Vacuette (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Rakousko)
- Plynový chromatograf GCMS-QP2010 SE (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Polypropylenové (PP) zkumavky s víčkem typu Eppendorf 1,5 ml a 2 ml (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Skleněné vialky se šroubovacím uzávěrem (Fisher Scientific spol. s.r.o., Pardubice, ČR)
- Skleněné inserty ND8, 200 μ l (Fisher Scientific, Pardubice, ČR)
- Koncentrátor vzorků Termovap TV10 (Ecom, Praha, ČR)
- Spektrofotometr UV-1800 (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Vortex Reax top (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Třepačka Reax Multi (Heidolph, Frankfurt nad Mohanem, Německo)
- Zařízení na úpravu vody Smart2pure (TKA, Niederelbert, Německo)

2.3 Pracovní roztoky

Příprava deionizované vody

Deionizovaná voda ($G = 0,055 \mu S$) byla získána zařízením na úpravu vody Smart2pure a před použitím přefiltrována skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 μm .

Příprava zásobního roztoku α -tokoferolu v ethanolu (asi 5 mmol/l)

Navážka 0,0215 g α -tokoferolu byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu, roztok pipetován po 1 ml do 1,5ml PP zkumavek a uchováván při $-80^\circ C$.

Příprava pracovního roztoku α -tokoferolu (asi 2525 $\mu mol/l$)

Pro přípravu pracovního roztoku α -tokoferolu byl použit zásobní roztok α -tokoferolu, který byl odpovídajícím způsobem naředěn ethanolem. Koncentrace pracovního roztoku byla ověřena spektrofotometricky při 292 nm ($E^{1\%} = 75,8$).

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolu-D₆ v ethanolu (asi 46 $\mu\text{mol/l}$)

Navážka 2 mg α -tokoferolu-D₆ byla rozpuštěna ve 100 ml ethanolu, roztok pipetován po 1 ml do 1,5ml PP zkumavek a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolu-D₆ (asi 2,3 $\mu\text{mol/l}$)

Pracovní roztok IS o koncentraci asi 2,3 $\mu\text{mol/l}$ byl připraven naředěním zásobního roztoku ethanollem (20 \times). Pracovní roztok IS byl připravován denně čerstvý.

Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (asi 3 mmol/l)

Navážka 0,0141 g α -tokoferolacetátu byla rozpuštěna v 10 ml ethanolu, roztok pipetován po 1 ml do 1,5ml PP zkumavek a uchováván při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (asi 200 $\mu\text{mol/l}$)

Pro přípravu pracovního roztoku α -tokoferolacetátu byl použit zásobní roztok α -tokoferolacetátu, který byl odpovídajícím způsobem naředěn ethanollem. Koncentrace pracovního roztoku byla ověřena spektrofotometricky při 285 nm ($E^{1\%} = 44$). Pracovní roztok IS byl připravován denně čerstvý.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (asi 50 $\mu\text{mol/l}$)

Pracovní roztok IS o koncentraci asi 50 $\mu\text{mol/l}$ byl připraven naředěním pracovního roztoku (asi 200 $\mu\text{mol/l}$) ethanollem (4 \times). Koncentrace pracovního roztoku byla ověřena spektrofotometricky při 285 nm ($E^{1\%} = 44$). Pracovní roztok IS byl připravován denně čerstvý.

Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu α -tokoferolacetátu (asi 2,5 $\mu\text{mol/l}$)

Pracovní roztok IS o koncentraci asi 2,5 $\mu\text{mol/l}$ byl připraven naředěním pracovního roztoku (asi 50 $\mu\text{mol/l}$) ethanollem (20 \times). Koncentrace pracovního roztoku byla ověřena spektrofotometricky při 285 nm ($E^{1\%} = 44$). Pracovní roztok IS byl připravován denně čerstvý.

2.4 Odběr venózní krve pro optimalizaci přípravy vzorků suché kapky krve a validaci metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Venózní krev byla získána od tří dobrovolníků, odběr krve byl proveden kvalifikovaným zdravotníkem do zkumavek s K₃EDTA. Dárci před odběrem krve poskytli informovaný souhlas.

2.5 Příprava kalibračních standardů α -tokoferolu

Pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS byla připravena osmibodová kalibrační řada v rozsahu koncentrací od 0 do 2525 $\mu\text{mol/l}$. Jednotlivé kalibrační standardy byly připraveny ředěním pracovního roztoku α -tokoferolu o koncentraci asi 2525 $\mu\text{mol/l}$ ethanolem. Příprava jednotlivých kalibračních standardů je uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3 Příprava jednotlivých kalibračních standardů α -tokoferolu

Standard	Koncentrace α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace α -T v krvi ($\mu\text{mol/l}$)	Pracovní roztok α -T (μl)	Ethanol (μl)
S1	25,0	0,50	10	990
S2	65,0	1,30	25	975
S3	125,0	2,50	25	475
S4	255,0	5,10	100	900
S5	630,0	12,60	250	750
S6	1265,0	25,30	500	500
S7	2525,0	50,50	100	0

2.6 Příprava kalibračních standardů v biologické matrici (venózní krvi)

Kalibrační standardy α -tokoferolu připravené ředěním pracovního roztoku ethanolem byly následně smíchány s venózní krví v poměru 49:1 (v/v). Kalibrační standard S0 byl připraven smícháním venózní krve s ethanolem ve stejném objemovém poměru 49:1 (v/v). Po důkladném promíchání byly jednotlivé kalibrační standardy pipetovány na filtrační papír (25 μl na předtřísťený kruh). Krev byla následně ponechána zaschnout při laboratorní teplotě po dobu

3 hodin. Po zaschnutí byl ze středu zaschlé krve vyražen disk o průměru 6 mm a uchován v 1,5ml PP zkumavce s víčkem typu Eppendorf při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

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

2.7.1 Přesnost v sérii a mezi sériemi

Pro určení přesnosti metody byly připraveny vzorky kontroly kvality s nízkou (QC_1), střední (QC_2) a vysokou (QC_3) hladinou α -tokoferolu, a to metodou přidavku standardu k venózní krvi v poměru 1:49 (v/v). Na jednu odběrovou kartu s 15 předtištěnými kruhy bylo pipetováno 25 μl celkem 15 vzorků QC_1 , na druhou 15 vzorků QC_2 a třetí 15 vzorků QC_3 . Po zaschnutí krve byl z každého vzorku DBS vyražen disk o průměru 6 mm a uchován v 1,5ml PP zkumavkách s víčkem typu Eppendorf při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy. První den bylo analyzováno 6 vzorků QC_1 – QC_3 (přesnost v sérii), následující den bylo analyzováno dalších 6 vzorků QC_1 – QC_3 (přesnost mezi sériemi).

2.7.2 Výtěžnost metody

Pro určení výtěžnosti metody byly připraveny vzorky venózní krve (V_1 – V_3) se třemi přidavky standardu α -tokoferolu (5,10; 12,60; 25,30 $\mu\text{mol/l}$) smícháním standardu α -tokoferolu v ethanolu s venózní krví v poměru 49:1 (v/v). Vzorek venózní krve s nulovým přidavkem α -tokoferolu (V_0) byl připraven smícháním krve s ethanolem ve stejném objemovém poměru. Takto připravené vzorky byly pipetovány (25 μl) na předtištěné kruhy filtračního papíru, vzorky byly připraveny v triplicátu. Po zaschnutí krve byl ze středu každého vzorku DBS vyražen disk o průměru 6 mm a uchován v 1,5ml PP zkumavkách s víčkem typu Eppendorf při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

2.7.3 Hodnocení vlivu vybraných parametrů na kvantitativní výsledky

Byl studován vliv vybraných parametrů na kvantitativní výsledky, konkrétně hodnota hematokritu, objem aplikované krve na filtrační papír a homogenita krevní skvrny. Pro tyto experimenty byly použity vzorky QC_1 – QC_3 . Každý vzorek QC byl připraven s hodnotou hematokritu 30 %, 45 % a 60 %.

2.7.3.1 Vliv hematokritu

Pro posouzení vlivu hematokritu na kvantitativní výsledky byly vzorky QC₁–QC₃ odstředěny (15 min, 1700 × g, laboratorní teplota) a získaná plazma přenesena do čistých zkumavek. Smícháním frakce erytrocytů a plazmy byly připraveny vzorky s hodnotou hematokritu 30 %, 45 % a 60 % (tabulka 4).

Tabulka 4 Příprava vzorků krve s různou hodnotou hematokritu

Hematokrit (%)	Plazma (μl)	Erytrocyty (μl)
30	1680	720
45	1320	1080
60	960	1440

2.7.3.2 Vliv objemu aplikované krve na filtrační papír

Vzorky QC s jednotlivými hodnotami hematokritu byly také využity pro studium vlivu objemu aplikované krve na kvantitativní výsledky. Každý vzorek (QC₁–QC₃), s hodnotou hematokritu 30 %, 45 % a 60 %, byl pipetován na filtrační papír v objemu 30 μl, 50 μl, 70 μl a 100 μl, vždy ve třech opakováních. Z krevní skvrny, kdy byl pipetován objem 100 μl, byly vyraženy 2 disky, jeden ze středu a druhý z periferie, byla tak hodnocena homogenita vzorku. Po zaschnutí krve při laboratorní teplotě byly ze středu všech krevních skvrn vyraženy disky o průměru 6 mm. Vyražené disky byly uchovávány v 2ml PP zkumavkách s víčkem typu Eppendorf při teplotě –80 °C až do doby analýzy.

2.7.3.3 Vliv homogenity krevní skvrny na kvantitativní výsledky

Homogenita DBS na filtračním papíře byla hodnocena s vzorky připravenými podle kapitoly 2.7.3.2, konkrétně z krevních skvrn, kdy byl aplikován objem 100 μl, u nichž lze jednoduše vyrazit 6mm disky jak ze středu, tak z periferie. Porovnáním koncentrace α-tokoferolu v discích vyražených ze středu a okraje krevní skvrny je možné posoudit míru homogenity vzorku DBS a případný vliv distribuce analytu v krevní skvrně.

2.7.4 Volba vnitřního standardu

Byly testovány dva IS, α -tokoferol-D₆ a α -tokoferolacetát. Kritériem volby IS byly parametry metody a ovlivnění stanovovaného analytu, α -tokoferolu. Bylo zjištěno, že α -tokoferolacetát ovlivňuje stanovení α -tokoferolu. Při použití α -tokoferolu-D₆ jako IS při konstrukci kalibračních křivek byly získány daleko lepší výsledky než v případě použití α -tokoferolacetátu (příloha 1–3).

2.8 Postup zpracování vzorků suché kapky krve

K vyraženému disku v 2ml zkumavce s víčkem typu Eppendorf bylo přidáno 200 μ l pracovního roztoku IS (α -tokoferol-D₆) o koncentraci asi 2,3 μ mol/l a obsah zkumavky třepán s mírnou intenzitou po dobu 30 minut. Poté bylo ke směsi přidáno 400 μ l deionizované vody a 1 ml hexanu, obsah zkumavky byl intenzivně třepán po dobu 5 minut a poté odstředěn (3 min, 6000 \times g, laboratorní teplota). Do čisté zkumavky bylo přeneseno 800 μ l horní hexanové vrstvy a krok extrakce opakován s 1 ml hexanu a do zkumavky přenesen 1 ml horní hexanové vrstvy. Hexan byl při laboratorní teplotě opatrně odpařen v proudu dusíku, odparek rozpuštěn v 200 μ l ethanolu a směs přenesena do vialky s insertem.

2.9 Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve

Linearita metody

Linearita vyjadřuje schopnost analytické metody poskytovat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovovaného analytu ve vzorku v určitém rozsahu. Jinými slovy, výsledky měření by měly odpovídat lineární závislosti mezi signálem přístroje a množstvím analytu ve vzorku. Obvykle se posuzuje v rámci daného rozsahu koncentrací standardních roztoků, ve kterém lze s vymezenou přesností a správností kvantifikovat analyt. Tento vztah lze graficky znázornit přímkou a hodnotit regresní analýzou [97].

Přesnost metody

Přesnost vyjadřuje míru shody mezi výsledky opakovaných měření stejného vzorku provedených za definovaných podmínek. Vlivem variabilních faktorů není dosažení absolutní

přesnosti možné. Pro vyjádření rozptylu dat je nejčastěji používána směrodatná odchylka (SD, z angl. standard deviation), jejíž výpočet je uveden v rovnici 1. K hodnocení relativní míry přesnosti slouží variační koeficient (CV, z angl. the coefficient of variation), který je vypočítán podle rovnice 2. Přesnost může být hodnocena několika způsoby v závislosti na podmínkách měření, v rámci jedné série (opakovatelnost), mezi více sériemi (mezilehlá přesnost) a přesnost mezi laboratořemi. Přesnost se může lišit v rámci rozsahu koncentrací analytu, proto je hodnocena na několika úrovních, nejlépe v blízkosti rozhodovací úrovně, například horní referenční mez [97].

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

Rovnice 1 Výpočet směrodatné odchylky (AVG, aritmetický průměr; x_i , naměřená koncentrace analytu ve vzorku; n , počet vzorků (měření) v sérii)

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

Rovnice 2 Výpočet variačního koeficientu (CV, variační koeficient; SD, směrodatná odchylka; AVG, aritmetický průměr)

Mez detekce a stanovitelnosti

Mez detekce (LOD, z angl. limit of detection) představuje nejmenší množství analytu, které je danou analytickou metodou spolehlivě detekovatelné. Existuje více způsobů výpočtu LOD v závislosti na použité metodě, přičemž je důležité, aby byl v rámci jednoho experimentálního souboru použit jednotný výpočetní postup. U separačních technik se LOD obvykle určuje jako trojnásobek šumu základní linie [97].

Mez stanovitelnosti (LOQ, z angl. limit of quantification) je nejmenší množství analytu, které je danou metodou možné nejen detekovat, ale i kvantitativně stanovit. LOQ se určuje jako desetinásobek šumu základní linie [97].

2.10 Podmínky plynové chromatografie

Hladina α -tokoferolu ve vzorcích DBS byla stanovena metodou GC–MS, pro separaci byla použita kolona HP–5ms [(5%-fenyl)-methylpolysiloxan; 30 m \times 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m; Agilent® J&W, Folsom, CA, USA]

GC podmínky:

- Nosný plyn: helium
- Celkový průtok nosného plynu: 6,9 ml/min
- Průtok nosného plynu kolonou: 1,3 ml/min
- Dávkovaný objem vzorku: 1 μ l, mód split (2)
- Teplota kolony: 280 °C (isotermická separace)
- Teplota nástřiku: 280 °C
- Celková doba analýzy: 7 min

MS podmínky:

- Ionizační technika: ionizace dopadem elektronu (70 eV)
- Režim měření: SIM
- Monitorované ionty: m/z 430 pro α -tokoferol; m/z 436 pro α -tokoferol-D₆
- Teplota rozhraní: 200 °C
- Teplota iontového zdroje: 280 °C

2.11 Vyhodnocení a zpracování výsledků

K vyhodnocení a řízení GC–MS byl použit software GCSolution, pro zpracování naměřených dat program MS Excel.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

α -Tokoferol, jeden z osmi isomerů vitamínu E, se vyznačuje nejvyšší biologickou aktivitou. Hraje zásadní úlohu v ochraně organismu před oxidačním stresem a přispívá k prevenci celé řady onemocnění, včetně kardiovaskulárních a neurodegenerativních poruch. Jeho hladina v krvi tak může sloužit jako užitečný ukazatel antioxidační kapacity organismu i nutričního stavu jedince. V klinické i výzkumné praxi proto roste zájem o jeho spolehlivé, správné a dostupné stanovení.

Inovace ve způsobu odběru krve jsou žádoucí. Jednou z perspektivních alternativ je technika DBS, která je v současné době čím dál více zmiňována. S ohledem na výhody techniky DBS, zejména jednoduchost, jen málo invazivní odběr a logistická nenáročnost, byla zvolena jako modelová matrice. V rámci diplomové práce byla pro účely optimalizace přípravy vzorku a metody použita venózní krev, která umožnila získat dostatečný objem vzorku pro vyhodnocení jednotlivých parametrů ovlivňujících kvantitativní výsledky.

Pro samotnou analýzu byla využita již dříve zavedená metoda GC–MS [98]. Hlavním cílem bylo ověřit, zda tato metoda poskytuje dostatečnou citlivost a reprodukovatelnost při stanovení nederivatizovaného α -tokoferolu ve vzorcích DBS.

Hlavní pozornost byla věnována optimalizaci přípravy vzorku a posouzení vlivu faktorů, jako jsou hodnota hematokritu, objem aplikované krve a homogenita vzorku na kvantitativní výsledky. Dále byl zvolen vhodnější IS z dvou, které byly k dispozici, tedy α -tokoferol-D₆ a hodnoceny základní analytické parametry metody, přesnost, výtěžnost, linearita, mez detekce a stanovitelnosti.

3.1 Analytické parametry metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve

3.1.1 Přesnost v sérii a mezi sériemi

Pro hodnocení přesnosti byly zvoleny vzorky QC₁, QC₂ a QC₃, jejichž hladiny byly v rozsahu kalibrační křivky (QC₁, bez přídatku α -tokoferolu, QC₂ s přídatkem α -tokoferolu s koncentrací

kalibračního standardu S₄ a QC₃ s přidavkem α -tokoferolu s koncentrací kalibračního standardu S₆). Výsledky přesnosti v sérii a mezi sériemi jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Přesnost metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Koncentrace α-tokoferolu ($\mu\text{mol/l}$)									
	AVG			SD			CV (%)		
Den	QC₁	QC₂	QC₃	QC₁	QC₂	QC₃	QC₁	QC₂	QC₃
1	6,09	6,35	6,46	0,96	0,45	0,35	15,8	7,1	5,4
2	6,07	6,54	7,16	0,30	0,76	1,03	4,9	11,6	14,4
Průměr	6,08	6,44	6,81	0,63	0,61	0,69	10,4	9,4	9,9

QC₁, bez přidavku α -tokoferolu; QC₂, s přidavkem α -tokoferolu s koncentrací kalibračního standardu S₄; QC₃, s přidavkem α -tokoferolu s koncentrací kalibračního standardu S₆; AVG, aritmetický průměr; SD, směrodatná odchylka; CV, variační koeficient

Z tabulky 5 lze vyčíst, že hodnota CV se pohybuje kolem 10 %, což odpovídá kritériím, která jsou akceptována v dokumentech dle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv, jenž požadují hodnoty CV ± 15 % [98]. Přestože v současné době není k dispozici publikace zabývající se stanovením α -tokoferolu ve vzorcích DBS metodou GC–MS, jsou naše výsledky porovnatelné s výsledky autorů stanovující hladinu α -tokoferolu metodou GC–MS ve vzorcích plazmy [98, 99].

3.1.2 Výtěžnost metody

Výsledky výtěžnosti metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS metodou GC–MS jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Výtěžnost metody stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

Standard	Teoretický přídavek α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Naměřená koncentrace α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Skutečný přídavek α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)
V ₀	0,00	6,02±0,17	–	–
V ₁	5,10	11,48±0,55	5,46	107,1
V ₂	12,60	14,77±0,20	8,75	69,4
V ₃	25,30	11,96±0,28	5,94	23,5

CV, variační koeficient

Jak již bylo uvedeno výše, není v současné době k dispozici práce zabývající se stanovením hladiny α -tokoferolu ve vzorcích DBS metodou GC–MS. Ve studii, kde autoři použili pro stanovení hladiny α -tokoferolu metodu RP–HPLC, byly výsledky výtěžnosti metody pro vzorky kontroly kvality s nízkou, střední a vysokou hladinou α -tokoferolu 95,8 %, 91,2 % a 93,1 % [98]. Kopčil a kol. uvádí výtěžnost v rozmezí 97,1–100,5 % pro vzorky plazmy a 92,2–96,6 % pro vzorky tkáně [98]. Příčinou nízké výtěžnosti může být nedostatečná extrakce α -tokoferolu ze vzorku DBS. Proto bude nutné v další studii testovat různá extrakční činidla a postupy extrakce. V této práci byl zvolen nejčastěji používaný postup extrakce α -tokoferolu ze vzorku plazmy. Zdá se, že pro vzorek DBS vhodný není a bude potřeba najít jiný postup dávající lepší výsledky výtěžnosti.

3.2 Vliv vybraných parametrů na kvantitativní výsledky

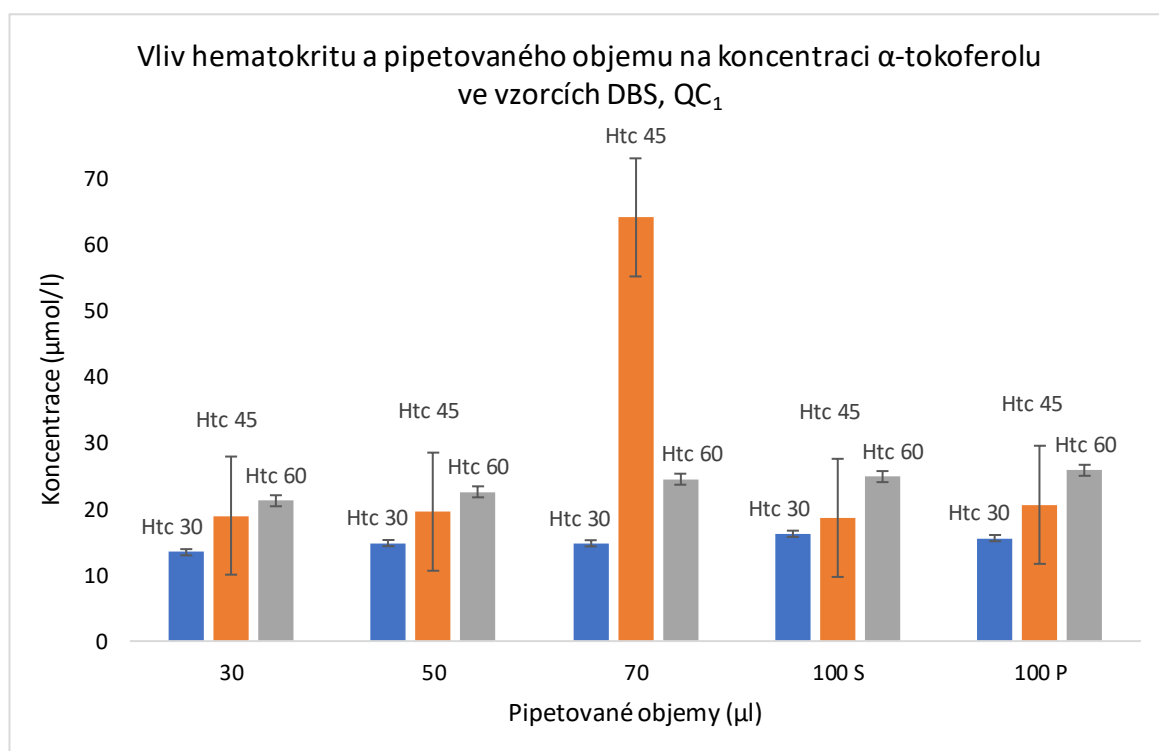
3.2.1 Vliv hematokritu a objemu pipetované krve na kvantitativní výsledky

Byl hodnocen vliv hematokritu a objemu krve pipetované na filtrační papír na výslednou koncentraci α -tokoferolu ve vzorcích DBS. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7 a zobrazeny v grafech 1–3, které ukazují závislost naměřené koncentrace α -tokoferolu na objemu aplikované krve při různých hladinách hematokritu.

Tabulka 7 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu krve na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

Koncentrace α -tokoferolu ($\mu\text{mol/l}$)									
Objem (μl)	QC ₁ Hematokrit (%)			QC ₂ Hematokrit (%)			QC ₃ Hematokrit (%)		
	30	45	60	30	45	60	30	45	60
30	13,46	19,00	21,25	15,75	18,62	36,85	22,22	20,68	33,00
50	14,84	19,60	22,60	13,54	19,75	35,89	19,88	28,61	32,84
70	14,81	64,15	24,51	17,30	25,96	33,17	18,15	27,80	30,41
100 S	16,26	18,66	24,91	15,38	26,90	36,32	17,82	29,14	35,47
100 P	15,60	20,64	25,86	14,56	32,05	32,34	17,09	30,03	34,96

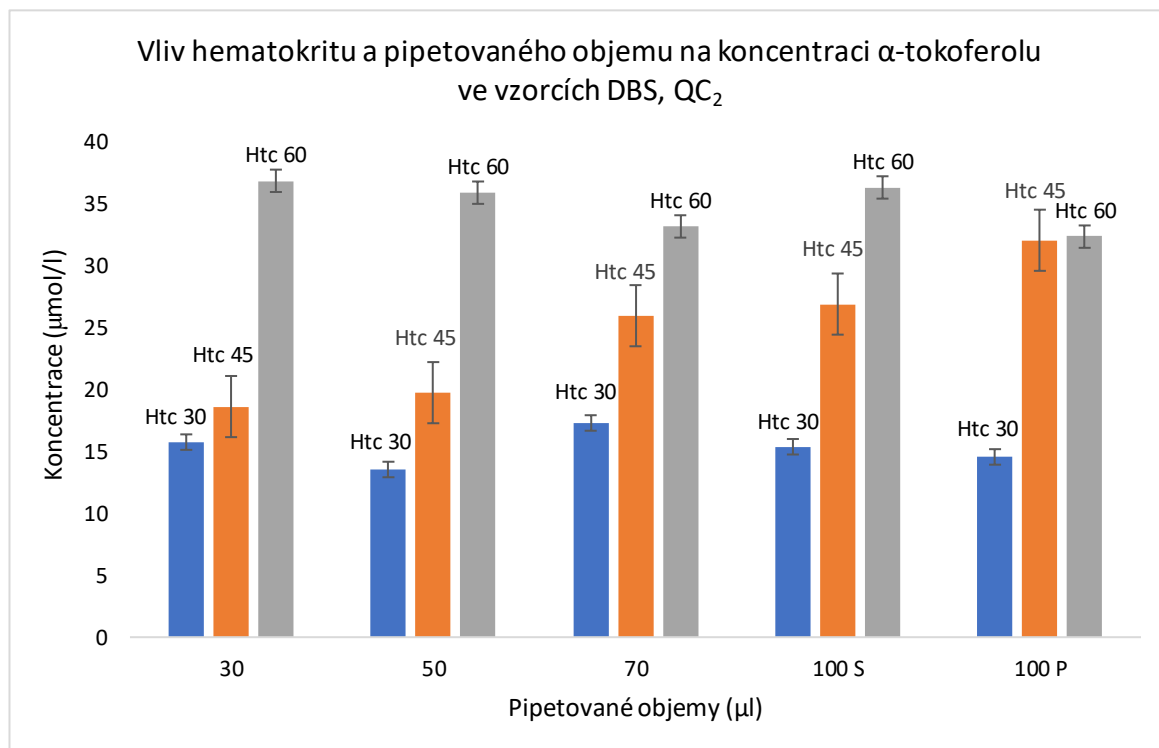
QC₁, bez přídavku α -tokoferolu; QC₂, s přídavkem α -tokoferolu s koncentrací kalibračního standardu S₄; QC₃, s přídavkem α -tokoferolu s koncentrací kalibračního standardu S₆; S, disk vyražený ze středu; P, disk vyražený z periferie.



S, disk vyražený ze středu; P, disk vyražený z periferie; Htc, hematokrit

Graf 1 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

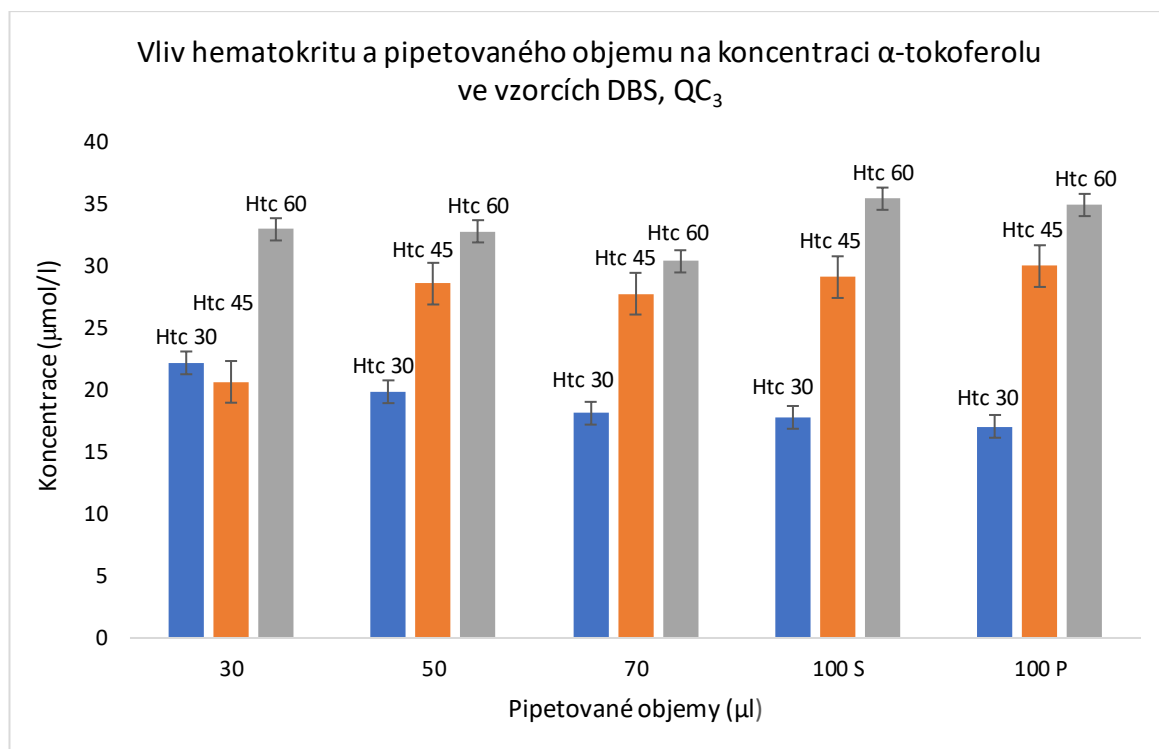
U vzorku QC₁ je z grafu patrné, že koncentrace α -tokoferolu roste s rostoucí hodnotou hematokritu, a to napříč všemi objemy. Mezi jednotlivými objemy nebyly výrazné rozdíly, což naznačuje, že pipetovaný objem krve na filtrační papír nemá zásadní vliv na výslednou koncentraci při dodržení stejného extrakčního postupu. Výsledky tedy poukazují na závislost koncentrace α -tokoferolu na obsahu erytrocytů ve vzorku. Výjimku tvoří hematokrit 45 % u pipetovaného objemu 70 μ l, kdy pravděpodobně nastala chyba při zpracování vzorku.



S, disk vyražený ze středu; P, disk vyražený z periferie; Htc, hematokrit

Graf 2 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

U vzorku QC₂ je z grafu patrné, že koncentrace α -tokoferolu roste s rostoucí hodnotou hematokritu, a to napříč všemi objemy. U vzorku QC₂ byly rozdíly mezi objemy více patrné než v případě vzorku QC₁.



S, disk vyražený ze středu; P, disk vyražený z periferie; Htc, hematokrit

Graf 3 Vliv hematokritu a pipetovaného objemu na koncentraci α -tokoferolu extrahovaného ze vzorku suché kapky krve

U vzorku QC₃ jako u předchozích dvou vzorků kontroly kvality roste koncentrace α -tokoferolu s rostoucí hodnotou hematokritu, a to napříč všemi objemy. Pouze u vzorku s hodnotou hematokritu 30 % je u objemu 30 µl mírně zvýšená oproti vzorku s hodnotou hematokritu 45 %, což může být způsobeno chybou při zpracování vzorku. Také u vzorku QC₃ jsou více patrné rozdíly mezi objemy než v případě vzorku QC₁.

I když není k dispozici práce, se kterou bychom mohli naše výsledky porovnat, je k dispozici mnoho publikací hodnotící vliv hodnoty hematokritu na koncentraci celé řady jiných analytů ve vzorku DBS. Inverzní vztah mezi hodnotou hematokritu a velikostí vzorku DBS (velikost vzorku DBS se snižuje se zvyšující se hodnotou hematokritu) významně ovlivňuje kvantifikaci biomarkerů ve vzorcích DBS, když je vyražen disk pevné velikosti. Bylo také popsáno, že plazma či sérum proniká do vláken filtračního papíru více než erythrocyty, které jsou tak soustředěny na periferii krevní skvrny [11, 27, 30]. Některé publikace však upozorňují na to, že změna velikosti krevní skvrny v daném rozsahu hodnoty hematokritu není výrazná, a tedy nemusí být jediným rozhodujícím faktorem ovlivňující kvantitativní výsledky [25, 100].

V literatuře byl také popsán vliv objemu pipetované krve na kvantifikaci analytů ve vzorcích DBS. Jedna ze studií, zaměřená na tento faktor, ukázala, že snížení objemu aplikované krve z 50 μl na 10 nebo 20 μl vedlo k výraznému poklesu koncentrace, a to napříč různými hladinami analytu, v některých případech až o 20 %. Naopak aplikace 75 μl krve vedla ke zvýšení koncentrace. I když tato studie se nezabývala stanovením α -tokoferolu ve vzorcích DBS, její závěry podporují tvrzení, že objem krve nanesený na odběrovou kartu při přípravě vzorku DBS má významný vliv na výslednou koncentraci analytu a měl by být při interpretaci výsledků vždy zohledněn [28].

3.2.2 Vliv homogenity suché kapky krve na koncentraci α -tokoferolu

Pro ověření homogenity vzorku DBS byla analyzována prostorová distribuce α -tokoferolu. Ze stejné krevní skvrny, získané pipetováním objemu 100 μl , byly vyraženy disky ze středové a periferní části, a to ve třech nezávislých opakováních pro vzorky QC₁–QC₃ u všech hladin hematokritu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8 Vliv homogenity na koncentraci α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve

Vzorek QC	Hematokrit (%)	Objem (μl)	Koncentrace α -T střed ($\mu\text{mol/l}$)	Koncentrace α -T periferie ($\mu\text{mol/l}$)	Rozdíl (absolutní)	Rozdíl (%)
1	30	100	16,26	15,60	0,66	4,1
	45	100	18,66	20,64	1,98	10,6
	60	100	24,91	25,86	0,95	3,8
2	30	100	15,38	14,56	0,82	5,3
	45	100	26,90	32,05	5,15	19,1
	60	100	36,32	32,34	3,98	11,0
3	30	100	17,82	17,09	0,73	4,1
	45	100	29,14	30,03	0,89	3,1
	60	100	35,47	34,96	0,51	1,4

Rozdíly v koncentraci α -tokoferolu v discích vyražených ze středu a periferie krevní skvrny byly v rozmezí 1,4–11,0 %, což naznačuje jen mírnou nehomogenitu krevní skvrny za testovaných podmínek. Nejvyšší rozdíly byly pozorovány při hodnotě hematokritu 45 % u vzorku QC₂, což může být chybou při zpracování vzorku.

Nerovnoměrné šíření analytu na filtračním papíře má dopad na jeho koncentraci. U některých analytů může rozdíl koncentrace v disku vyraženém ze středu a periferie krevní skvrny dosahovat až 35 %. Tyto poznatky je třeba zohlednit při interpretaci výsledků, zejména pokud není homogenita analyzovaného analytu jednoznačně ověřena [11, 28, 30].

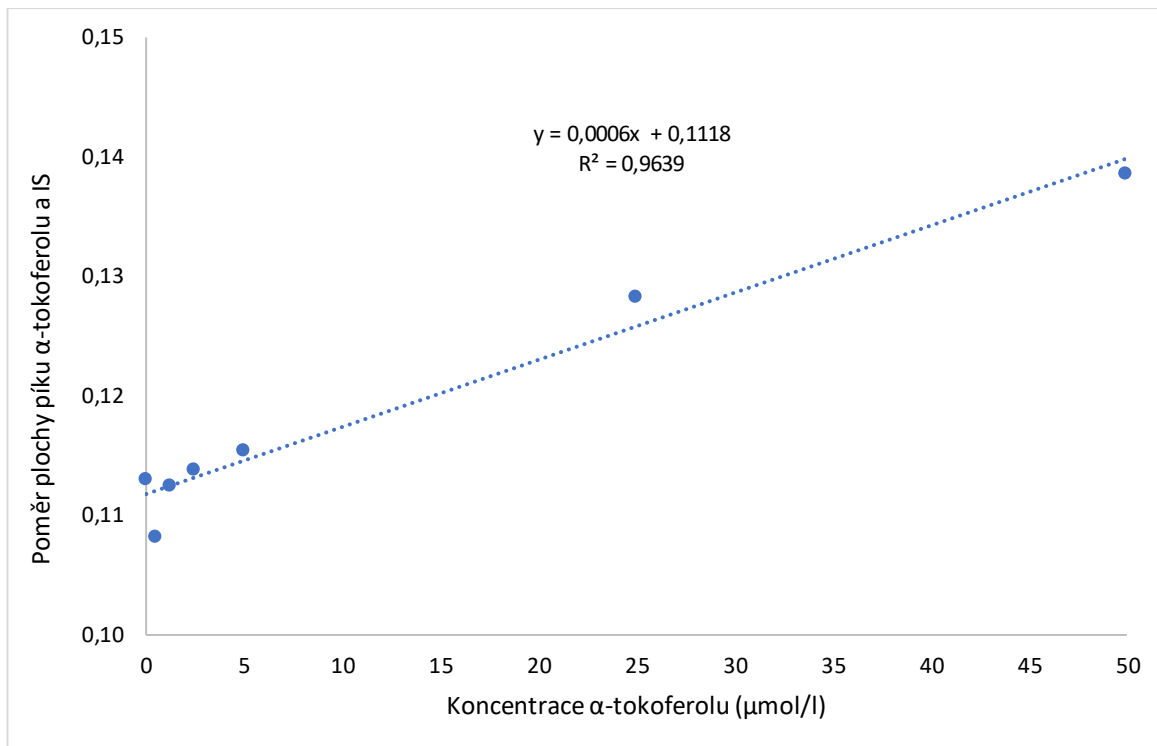
3.3 Analytické parametry metody plynové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení α -tokoferolu ve vzorku suché kapky krve

3.3.1 Linearita metody

Linearita metody byla studována v rozsahu koncentrací 0,00–50,50 $\mu\text{mol/l}$. V tabulce 9 a grafu 4 jsou uvedeny výsledky vybrané kalibrační křivky, kdy po vyloučení jedné odlehle hodnoty byl korelační koeficient $R = 0,9818$.

Tabulka 9 Plochy píků α -tokoferolu a α -tokoferolu- D_6 kalibračních standardů připravených v plné krvi

	Koncentrace α -T ($\mu\text{mol/l}$)	Plocha píku α -T	Plocha píku IS	Poměr ploch píků α -T/IS
S0	0,00	16167	143231	0,113
S1	0,50	16945	156678	0,108
S2	1,30	17690	157316	0,112
S3	2,50	17169	150700	0,114
S4	5,10	18528	160512	0,115
S5	12,60	480215	173299	2,771
S6	25,30	20973	163138	0,129
S7	50,50	22246	160531	0,139



Graf 4 Stanovení α -tokoferolu ve vzorcích suché kapky krve, kalibrační křivka

Z grafu 4 je patrné, že v rozsahu nízkých koncentrací není dosažena lineární závislost. Problémem je, že kalibrační křivka je konstruována tak, že standardy α -tokoferolu připravené v ethanolu jsou přidávány ke vzorku krve, a to v takovém poměru, aby se nezměnila matrice vzorku. Při určení analytických parametrů byly získány málo uspokojivé výsledky přesnosti a zcela neuspokojivé výsledky výtěžnosti, což má vliv na výsledky linearit metody a naopak. Pro porovnání uvádíme kalibrační křivky, kdy jednotlivé standardy byly připraveny ředěním pracovního roztoku α -tokoferolu pouze ethanolom (příloha 1–3).

3.3.2 Mez detekce a stanovitelnosti

V rámci této práce nebyly určeny hodnoty LOD a LOQ, a to z důvodu nereprodukovatelnosti kalibračních křivek. Hodnoty vypočtené na základě průměrné směrnice a standardní odchylky úseku 5 kalibračních křivek byly nepřijatelné.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda metoda GC–MS je dostatečně citlivá pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS, bez jeho předchozí derivatizace. I když byl touto metodou α -tokoferol ve vzorcích DBS kvantifikován, analytické parametry metody jsou neuspokojivé. Největším problémem byla nereprodukovatelnost kalibračních křivek. Důvodem zřejmě je nereprodukovatelná výtěžnost α -tokoferolu přidávaného ke vzorku krve při přípravě kalibračních standardů. Proto hladiny α -tokoferolu odečítané z takovýchto kalibračních křivek nemusí odpovídat skutečnosti a nelze garantovat získané výsledky při jednotlivých studiích, jako jsou analytické parametry metody, vliv hodnoty hematokritu a velikosti nanášeného objemu na koncentraci α -tokoferolu ve vzorcích DBS. Přes tato omezení práce přinesla několik důležitých poznatků, z kterých lze vycházet při pokračování vývoje a validace metody GC–MS pro stanovení α -tokoferolu ve vzorcích DBS. Bylo zjištěno, že α -tokoferol se na filtračním papíru šíří celkem rovnoměrně, hodnota hematokritu má vliv na koncentraci α -tokoferolu, ale jen malý, a že pokud bude na filtrační papír nanášen objem krve v úzkém rozmezí, mezi 50–70 μ l krve, nebude to mít zásadní vliv na koncentraci.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Herbert McLean Evans, 1882-1971. Online. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society*. 1972, roč. 18, s. 82-186. ISSN 0080-4606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rsbm.1972.0005>.
- [2] TRABER, Maret G. a ATKINSON, Jeffrey. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007, roč. 43, č. 1, s. 4-15. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024>.
- [3] EVANS, Herbert M. a BISHOP, K. Scott. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. Online. *Science*. 1922, roč. 56, č. 1458, s. 650-651. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.56.1458.650>.
- [4] BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina a TRABER, Maret G. Vitamin E: function and metabolism. Online. *The FASEB Journal*. 1999, roč. 13, č. 10, s. 1145-1155. ISSN 0892-6638. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.10.1145>.
- [5] SABLIOV, Cristina M.; FRONCZEK, C.; ASTETE, C. E.; KHACHATURYAN, M.; KHACHATRYAN, L. et al. Effects of Temperature and UV Light on Degradation of α -Tocopherol in Free and Dissolved Form. Online. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2009, roč. 86, č. 9. ISSN 0003-021X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1411-6>.
- [6] MEI, Joanne V.; ALEXANDER, J. Richard; ADAM, Barbara W. a HANNON, W. Harry. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens. Online. *The Journal of Nutrition*. 2001, roč. 131, č. 5, s. 1631S-1636S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1631S>.
- [7] WAGNER, Michel; TONOLI, David; VARESI, Emmanuel a HOPFGARTNER, Gérard. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. Online. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016, roč. 35, č. 3, s. 361-438. ISSN 0277-7037. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.21441>.

- [8] KEEVIL, Brian G. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Online. *Clinical Biochemistry*. 2011, roč. 44, č. 1, s. 110-118. ISSN 00099120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.014>.
- [9] MILLINGTON, D. S.; KODO, N.; NORWOOD, D. L. a ROE, C. R. Tandem mass spectrometry: A new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. Online. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1990, roč. 13, č. 3, s. 321-324. ISSN 0141-8955. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF01799385>.
- [10] CHACE, D H; MILLINGTON, D S; TERADA, N; KAHLER, S G; ROE, C R et al. Rapid diagnosis of phenylketonuria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. Online. *Clinical Chemistry*. 1993, roč. 39, č. 1, s. 66-71. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.1.66>.
- [11] MOAT, Stuart J.; GEORGE, Roanna S. a CARLING, Rachel S. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. Online. *International Journal of Neonatal Screening*. 2020, roč. 6, č. 2. ISSN 2409-515X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijns6020026>.
- [12] MARTIAL, Lisa C.; AARNOUTSE, Rob E.; SCHREUDER, Michiel F.; HENRIET, Stefanie S.; BRÜGGEMANN, Roger J. M. et al. Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children. Online. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 12. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167433>.
- [13] ENDERLE, Yeliz; FOERSTER, Kathrin a BURHENNE, Jürgen. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, roč. 130, s. 231-243. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.026>.
- [14] 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. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.9(9).3597-07.

[15] YU, Chaowen; HUANG, Shuodan; WANG, Ming; ZHANG, Juan; LIU, Hao et al. A novel tandem mass spectrometry method for first-line screening of mainly beta-thalassemia from dried blood spots. Online. *Journal of Proteomics*. 2017, roč. 154, s. 78-84. ISSN 18743919. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.12.008>.

[16] KIM, Borahm; LEE, Mi-Na; PARK, Hyung-Doo; KIM, Jong Won; CHANG, Yun Sil et al. Dried Blood Spot Testing for Seven Steroids Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry With Reference Interval Determination in the Korean Population. Online. *Annals of Laboratory Medicine*. 2015, roč. 35, č. 6, s. 578-585. ISSN 2234-3806. Dostupné z: <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.578>.

[17] OLAGUNJU, Adeniyi; BOLAJI, Oluseye O.; AMARA, Alieu; WAITT, Catriona; ELSE, Laura et al. Development, validation and clinical application of a novel method for the quantification of efavirenz in dried breast milk spots using LC-MS/MS. Online. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015, roč. 70, č. 2, s. 555-561. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dku420>.

[18] GRÜNER, Nico; STAMBOULI, Oumaima a ROSS, R. Stefan. Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. Online. *Journal of Visualized Experiments*. 2015, č. 97. ISSN 1940-087X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/52619>.

[19] GEORGE, Roanna S a MOAT, Stuart J. Effect of Dried Blood Spot Quality on Newborn Screening Analyte Concentrations and Recommendations for Minimum Acceptance Criteria for Sample Analysis. Online. *Clinical Chemistry*. 2016, roč. 62, č. 3, s. 466-475. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.247668>.

[20] LI, Wenkui a LEE, Mike S. (ed.). *Dried Blood Spots*. Online. Wiley, 2014. ISBN 9781118054697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118890837>.

[21] VEENHOF, Herman; KOSTER, Remco A.; BRINKMAN, Randy; SENTURK, Enes; BAKKER, Stephan J.L. et al. Performance of a web-based application measuring spot quality in dried blood spot sampling. Online. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2019, roč. 57, č. 12, s. 1846-1853. ISSN 1437-4331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0437>.

- [22] BJÖRKESTEN, Johan; ENROTH, Stefan; SHEN, Qiujin; WIK, Lotta; HOUGAARD, David M. et al. Stability of Proteins in Dried Blood Spot Biobanks. Online. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2017, roč. 16, č. 7, s. 1286-1296. ISSN 15359476. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/mcp.RA117.000015>.
- [23] CHEN, Xiaohui; ZHAO, Hongjuan; HATSIS, Panos a AMIN, Jakal. Investigation of dried blood spot card-induced interferences in liquid chromatography/mass spectrometry. Online. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012, roč. 61, s. 30-37. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.015>.
- [24] LI, Wenkui a TSE, Francis L. S. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. Online. *Biomedical Chromatography*. 2010, roč. 24, č. 1, s. 49-65. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.1367>.
- [25] LIM, Mark D. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. Online. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018, roč. 99, č. 2, s. 256-265. ISSN 0002-9637. Dostupné z: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0889>.
- [26] MURPHY, Sean C.; DAZA, Glenda; CHANG, Ming a COOMBS, Robert. Laser Cutting Eliminates Nucleic Acid Cross-Contamination in Dried-Blood-Spot Processing. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, roč. 50, č. 12, s. 4128-4130. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.02549-12>.
- [27] LI, Fumin; PLOCH, Stephen; FAST, Douglas a MICHAEL, Steve. Perforated dried blood spot accurate microsampling: the concept and its applications in toxicokinetic sample collection. Online. *Journal of Mass Spectrometry*. 2012, roč. 47, č. 5, s. 655-667. ISSN 1076-5174. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jms.3015>.
- [28] LAWSON, AJ; BERNSTONE, L a HALL, SK. Newborn screening blood spot analysis in the UK: influence of spot size, punch location and haematocrit. Online. *Journal of Medical Screening*. 2016, roč. 23, č. 1, s. 7-16. ISSN 0969-1413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/0969141315593571>.

[29] MOAT, Stuart J; DIBDEN, Catherine; TETLOW, Lesley; GRIFFITH, Caroline; CHILCOTT, Jim et al. Effect of Blood Volume on Analytical Bias in Dried Blood Spots Prepared for Newborn Screening External Quality Assurance. Online. *Bioanalysis*. 2020, roč. 12, č. 2, s. 99-109. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0201>.

[30] HOLUB, Margareta; TUSCHL, Karin; RATSCHMANN, Rene; STRNADOVÁ, Kristina Anna; MÜHL, Adolf et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. Online. *Clinica Chimica Acta*. 2006, roč. 373, č. 1-2, s. 27-31. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.04.013>.

[31] DENNIFF, Philip a SPOONER, Neil. The Effect of Hematocrit on Assay Bias When Using DBS Samples for The Quantitative Bioanalysis of Drugs. Online. *Bioanalysis*. 2010, roč. 2, č. 8, s. 1385-1395. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/bio.10.103>.

[32] O'MARA, M; HUDSON-CURTIS, B; OLSON, K; YUEH, Y; DUNN, J et al. The Effect of Hematocrit and Punch Location on Assay Bias During Quantitative Bioanalysis of Dried Blood Spot Samples. Online. *Bioanalysis*. 2011, roč. 3, č. 20, s. 2335-2347. ISSN 1757-6180. Dostupné z: <https://doi.org/10.4155/bio.11.220>.

[33] OLIVEIRA, Elcio Cruz de; MULLER, Edson I.; ABAD, Fernanda; DALLAROSA, Juliana a ADRIANO, Cristine. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. Online. *Química Nova*. 2010, roč. 33, č. 4, s. 984-987. ISSN 0100-4042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400041>.

[34] MCCLENDON-WEARY, Bryttany; PUTNICK, Diane L.; ROBINSON, Sonia a YEUNG, Edwina. Little to Give, Much to Gain—What Can You Do With a Dried Blood Spot? Online. *Current Environmental Health Reports*. 2020, roč. 7, č. 3, s. 211-221. ISSN 2196-5412. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40572-020-00289-y>.

[35] RAJATILEKA, Shavanthi; LUYT, Karen; EL-BOKLE, Manal; WILLIAMS, Maggie; KEMP, Helena et al. Isolation of human genomic DNA for genetic analysis from premature neonates: a comparison between newborn dried blood spots, whole blood and umbilical cord

tissue. Online. *BMC Genetics*. 2013, roč. 14, č. 1. ISSN 1471-2156. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-105>.

[36] MALSAGOVA, Kristina; KOPYLOV, Artur; STEPANOV, Alexander; BUTKOVA, Tatyana; IZOTOV, Alexander et al. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. Online. *Diagnostics*. 2020, roč. 10, č. 4. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10040248>.

[37] MARTIAL, Lisa C.; AARNOUTSE, Rob E.; SCHREUDER, Michiel F.; HENRIET, Stefanie S.; BRÜGGEMANN, Roger J. M. et al. Cost Evaluation of Dried Blood Spot Home Sampling as Compared to Conventional Sampling for Therapeutic Drug Monitoring in Children. Online. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 12. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167433>.

[38] LU, Dasheng; WANG, Dongli; IP, Ho Sai Simon; BARLEY, Frank; RAMAGE, Robert et al. Measurements of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in a single drop of blood. Online. *Journal of Chromatography B*. 2012, roč. 891-892, s. 36-43. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.016>.

[39] NIEMIEC, Agnieszka. Dried Blood Spot in Toxicology: Current Knowledge. Online. *Separations*. 2021, roč. 8, č. 9. ISSN 2297-8739. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/separations8090145>.

[40] DAOUSANI, Chrysa; KARALIS, Vangelis; MALENOVIĆ, Anđelija a DOTSIKAS, Yannis. Hematocrit effect on dried blood spots in adults: a computational study and theoretical considerations. Online. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 2019, roč. 79, č. 5, s. 325-333. ISSN 0036-5513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00365513.2019.1622033>.

[41] BEHETS, F; KASHAMUKA, M; PAPPALIOANOU, M; GREEN, T A; RYDER, R W et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire. Online. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992, roč. 30, č. 5, s. 1179-1182. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.5.1179-1182.1992>.

[42] Co je novorozenecký screening. Novorozenecký screening [online]. 2013 Dostupné z: <https://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening>

[43] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011). Ten great public health achievements--United States, 2001-2010. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 60(19), 619–623.

[44] CAGGANA, Michele; JONES, Elizabeth A.; SHAHIED, S.I.; TANKSLEY, Susan; HERMERATH, Cheryl A. et al. Newborn Screening: From Guthrie to Whole Genome Sequencing. Online. *Public Health Reports®*. 2013, roč. 128, č. 2_suppl, s. 14-19. ISSN 0033-3549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/00333549131280S204>.

[45] MAK, Chloe Miu; LEE, Han-Chih Hencher; CHAN, Albert Yan-Wo a LAM, Ching-Wan. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. Online. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2013, roč. 50, č. 6, s. 142-162. ISSN 1040-8363. Dostupné z: <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.847896>.

[46] CASSOL, Sharon A; READ, Stanley; WENIGER, Bruce G; GOMEZ, Perry; LAPOINTE, Normand et al. Dried blood spots collected on filter paper: an international resource for the diagnosis and genetic characterization of human immunodeficiency virus Type-1. Online. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996, roč. 91, č. 3, s. 351-358. ISSN 0074-0276. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000300019>.

[47] PARKER, S P a CUBITT, W D. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. Online. *Journal of Clinical Pathology*. 1999, roč. 52, č. 9, s. 633-639. ISSN 0021-9746. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/jcp.52.9.633>.

[48] HOFMAN, L F; FOLEY, T P; HENRY, J J a NAYLOR, E W. Original Paper: Assays for thyroid-stimulating hormone using dried blood spotted filter paper specimens to screen for hypothyroidism in older children and adults. Online. *Journal of Medical Screening*. 2003, roč. 10, č. 1, s. 5-10. ISSN 0969-1413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1258/096914103321610734>.

[49] FACHIROH, J.; PRASETYANTI, P. R.; PARAMITA, D. K.; PRASETYAWATI, A. T.; ANGGRAHINI, D. W. et al. Dried-Blood Sampling for Epstein-Barr Virus Immunoglobulin G (IgG) and IgA Serology in Nasopharyngeal Carcinoma Screening. Online. *Journal of Clinical*

Microbiology. 2008, roč. 46, č. 4, s. 1374-1380. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.01368-07>.

[50] HELFAND, Rita F.; CABEZAS, Cesar; ABERNATHY, Emily; CASTILLO-SOLORZANO, Carlos; ORTIZ, Ana Cecilia et al. Dried Blood Spots versus Sera for Detection of Rubella Virus-Specific Immunoglobulin M (IgM) and IgG in Samples Collected during a Rubella Outbreak in Peru. Online. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2007, roč. 14, č. 11, s. 1522-1525. ISSN 1556-6811. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CVI.00144-07>.

[51] CERVINKOVA, Barbora; KRCMOVA, Lenka Kujovska; SOLICHOVA, Dagmar; MELICHAR, Bohuslav a SOLICH, Petr. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2407-2424. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9214-0>.

[52] GREBENSTEIN, Nadine a FRANK, Jan. 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. Online. *Journal of Chromatography A*. 2012, roč. 1243, s. 39-46. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.042>.

[53] PLÍŠEK, Jiří; KAŠPAROVÁ, Markéta; SOLICHOVÁ, Dagmar; KRČMOVÁ, Lenka; KUČEROVÁ, Barbora et al. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. Online. *Talanta*. 2013, roč. 107, s. 382-388. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.031>.

[54] ZHAO, Yang; LEE, Mao-Jung; CHEUNG, Connie; JU, Ji-Hyeung; CHEN, Yu-Kuo et al. Analysis of Multiple Metabolites of Tocopherols and Tocotrienols in Mice and Humans. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, roč. 58, č. 8, s. 4844-4852. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf904464u>.

[55] RUPÉREZ, F.J; MARTÍN, D; HERRERA, E a BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. Online. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 935, č. 1-2, s. 45-69. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01101-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01101-3).

[56] CHATZIMICHALAKIS, Pavlos F; SAMANIDOU, Victoria F a PAPADOYANNIS, Ioannis N. Development of a validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of eight fat-soluble vitamins in biological fluids after solid-phase extraction. Online. *Journal of Chromatography B*. 2004, roč. 805, č. 2, s. 289-296. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.009>.

[57] BURTON, Graham W.; WEBB, Ann a INGOLD, Keith U. A mild, rapid, and efficient method of lipid extraction for use in determining vitamin E/lipid ratios. Online. *Lipids*. 1985, roč. 20, č. 1, s. 29-39. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02534359>.

[58] ANDREOLI, Roberta; MANINI, Paola; POLI, Diana; BERGAMASCHI, Enrico; MUTTI, Antonio et al. 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. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, roč. 378, č. 4, s. 987-994. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2288-0>.

[59] MONTERO, Olimpio; RAMÍREZ, María; SÁNCHEZ-GUIJO, Alberto a GONZÁLEZ, Constancio. Determination of lipoic acid, Trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry. Online. *Biomedical Chromatography*. 2012, roč. 26, č. 10, s. 1228-1233. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.2683>.

[60] HENSLEY, Kenneth a WILLIAMSON, Kelly S. HPLC-Electrochemical Detection of Tocopherol Products as Indicators of Reactive Nitrogen Intermediates. Online. In: *Nitric Oxide, Part E*. Methods in Enzymology. Elsevier, 2005, s. 171-182. ISBN 9780121828011. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)96017-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)96017-5).

[61] PALIAKOV, Ekaterina M.; CROW, Brian S.; BISHOP, Michael J.; NORTON, Dean; GEORGE, Joe et al. 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. Online. *Journal of Chromatography B*. 2009, roč. 877, č. 1-2, s. 89-94. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.012>.

- [62] RODEMEISTER, Sandra; DUQUESNE, Mathieu; ADOLPH, Michael; NOHR, Donatus; BIESALSKI, Hans K. et al. Massive and long-lasting decrease in vitamin C plasma levels as a consequence of extracorporeal circulation. Online. *Nutrition*. 2014, roč. 30, č. 6, s. 673-678. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.026>.
- [63] LEE, Bee-Lan; NEW, Ai-Li a ONG, Choon-Nam. Simultaneous Determination of Tocotrienols, Tocopherols, Retinol, and Major Carotenoids in Human Plasma. Online. *Clinical Chemistry*. 2003, roč. 49, č. 12, s. 2056-2066. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.022681>.
- [64] KRČMOVÁ, Lenka; URBÁNEK, Lubor; SOLICHOVÁ, Dagmar; KAŠPAROVÁ, Markéta; VLČKOVÁ, Hana et al. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. Online. *Journal of Separation Science*. 2009, roč. 32, č. 15-16, s. 2804-2811. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200900239>.
- [65] CITOVÁ, I.; HAVLÍKOVÁ, L.; URBÁNEK, L.; SOLICHOVÁ, D.; NOVÁKOVÁ, L. et al. 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. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, roč. 388, č. 3, s. 675-681. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1237-8>.
- [66] ŘIMNÁČOVÁ, L.; HUŠEK, P. a ŠIMEK, P. 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. Online. *Journal of Chromatography A*. 2014, roč. 1339, s. 154-167. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.007>.
- [67] ROMEU-NADAL, M.; MORERA-PONS, S.; CASTELLOTE, A.I. a LÓPEZ-SABATER, M.C. 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. Online. *Journal of Chromatography A*. 2006, roč. 1114, č. 1, s. 132-137. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.049>.

[68] VATASSERY, G.T.; SMITH, W.E. a QUACH, H.T. 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. Online. *Analytical Biochemistry*. 1993, roč. 214, č. 2, s. 426-430. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1518>.

[69] RUPÉREZ, F.J; BARBAS, C; CASTRO, M; MARTÍNEZ, S a HERRERA, E. Simplified method for vitamin E determination in rat adipose tissue and mammary glands by high-performance liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 1998, roč. 823, č. 1-2, s. 483-487. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00206-4).

[70] VAGNI, Simona; SACCONI, Francesca; PINOTTI, Luciano a BALDI, Antonella. Vitamin E Bioavailability: Past and Present Insights. Online. *Food and Nutrition Sciences*. 2011, roč. 02, č. 10, s. 1088-1096. ISSN 2157-944X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/fns.2011.210146>.

[71] LIU, Zhiyong; KANG, Xuejun a FANG, Fang. Solid phase extraction with electrospun nanofibers for determination of retinol and α -tocopherol in plasma. Online. *Microchimica Acta*. 2010, roč. 168, č. 1-2, s. 59-64. ISSN 0026-3672. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00604-009-0263-y>.

[72] THEODORIDIS, G; KOSTER, E.H.M a DE JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. Online. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, roč. 745, č. 1, s. 49-82. ISSN 03784347. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00203-6).

[73] SUNARIĆ, Slavica; LALIĆ, Jelena a SPASIĆ, Ana. Simultaneous Determination of Alpha-Tocopherol and Alpha-Tocopheryl Acetate in Dairy Products, Plant Milks and Health Supplements by Using SPE and HPLC Method. Online. *Food Analytical Methods*. 2017, roč. 10, č. 12, s. 3886-3901. ISSN 1936-9751. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0943-x>.

[74] PLÍŠEK, Jiří; POSPÍCHALOVÁ, Nad'a; KHALIKOVA, Maria; AUFARTOVÁ, Jana; SOLICHOVÁ, Dagmar et al. Combination of ultracentrifugation and solid-phase extraction

with subsequent chromatographic analysis of α -tocopherol in erythrocyte membranes. Online. *Journal of Separation Science*. 2015, roč. 38, č. 4, s. 634-640. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.201401036>.

[75] PRIEGO CAPOTE, Feliciano; JIMÉNEZ, José Ruiz; GRANADOS, José María Mata a DE CASTRO, María Dolores Luque. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. Online. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, roč. 21, č. 11, s. 1745-1754. ISSN 0951-4198. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/rcm.3014>.

[76] Books in Brief. Online. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 1997, roč. 80, č. 6, s. 127A-128A. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jaoac/80.6.127A>.

[77] QIAN, H a SHENG, M. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins A, D and E and pro-vitamin D2 in animal feeds by one-step extraction and high-performance liquid chromatography analysis. Online. *Journal of Chromatography A*. 1998, roč. 825, č. 2, s. 127-133. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00733-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00733-X).

[78] FRANKE, Adrian A.; MORRISON, Cynthia M.; CUSTER, Laurie J.; LI, Xingnan a LAI, Jennifer F. Simultaneous analysis of circulating 25-hydroxy-vitamin D3, 25-hydroxy-vitamin D2, retinol, tocopherols, carotenoids, and oxidized and reduced coenzyme Q10 by high performance liquid chromatography with photo diode-array detection using C18 and C30 columns alone or in combination. Online. *Journal of Chromatography A*. 2013, roč. 1301, s. 1-9. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.027>.

[79] CERVINKOVA, Barbora; KRCMOVA, Lenka Kujovska; KLABACKOVA, Sava; SOLICHOVA, Dagmar a SOLICH, Petr. Rapid determination of lipophilic vitamins in human serum by ultra-high performance liquid chromatography using a fluorinated column and high-throughput miniaturized liquid-liquid extraction. Online. *Journal of Separation Science*. 2017, roč. 40, č. 17, s. 3375-3382. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700492>.

[80] ZASPEL, Beverly J. a CSALLANY, A.Saari. Determination of alpha-tocopherol in tissues and plasma by high-performance liquid chromatography. Online. *Analytical Biochemistry*.

1983, roč. 130, č. 1, s. 146-150. ISSN 00032697. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90661-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90661-9).

[81] SARZANINI, Corrado; MENTASTI, Edoardo; VINCENTI, Marco; NERVA, Mario a GAIDO, Flavio. Determination of plasma tocopherols by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. Online. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1993, roč. 620, č. 2, s. 268-272. ISSN 03784347. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(93\)80015-V](https://doi.org/10.1016/0378-4347(93)80015-V).

[82] RISS, Georges; KORMANN, Alfred W.; GLINZ, Ernst; WALTHER, Willi a RANALDER, Urs B. [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. Online. In: *Oxygen Radicals in Biological Systems Part D. Methods in Enzymology*. Elsevier, 1994, s. 302-310. ISBN 9780121821357. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34097-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34097-8).

[83] HÖLLER, Ulrich; BAKKER, Stephan J.L.; DÜSTERLOH, Andre; FREI, Balz; KÖHRLE, Josef et al. Micronutrient status assessment in humans: Current methods of analysis and future trends. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018, roč. 102, s. 110-122. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.001>.

[84] FU, Ju-Yen; HTAR, Thet-Thet; DE SILVA, Leanne; TAN, Doryn a CHUAH, Lay-Hong. Chromatographic Separation of Vitamin E Enantiomers. Online. *Molecules*. 2017, roč. 22, č. 2. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22020233>.

[85] KAMAL-ELDIN, Afaf a APPELQVIST, Lars-Åke. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. Online. *Lipids*. 1996, roč. 31, č. 7, s. 671-701. ISSN 0024-4201. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF02522884>.

[86] EITENMILLER, Ronald R. a LEE, Junsoo. *Vitamin E*. Online. CRC Press, 2004. ISBN 9780203970140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1201/9780203970140>.

[87] CIMADEVILLA, Henar M.; HEVIA, David; MIAR, Ana; MAYO, Juan C.; LOMBO, Felipe et al. Development and validation of a single HPLC method for determination of α - tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. Online. *Biomedical*

Chromatography. 2015, roč. 29, č. 6, s. 843-852. ISSN 0269-3879. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bmc.3362>.

[88] LECHNER, Marion; REITER, Birgit a LORBEER, Eberhard. Determination of tocopherols and sterols in vegetable oils by solid-phase extraction and subsequent capillary gas chromatographic analysis. Online. *Journal of Chromatography A*. 1999, roč. 857, č. 1-2, s. 231-238. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00751-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00751-7).

[89] DEMIRKAYA, Fatma a KADIOGLU, Yucel. Simple GC-FID method development and validation for determination of α -tocopherol (vitamin E) in human plasma. Online. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007, roč. 70, č. 3, s. 363-368. ISSN 0165022X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.08.006>.

[90] KUSCH, Peter. Introductory Chapter: Gas Chromatography - The Most Versatile Analytical Technique. Online. In: KUSCH, Peter (ed.). *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application*. IntechOpen, 2019. ISBN 978-1-83881-865-4. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.81693>.

[91] SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James a CROUCH, Stanley R. *Principles of instrumental analysis*. Seventh edition. Boston: Cengage Learning, [2018]. ISBN 978-1-305-57721-3.

[92] NIKOLIN, Branko; IMAMOVIĆ, Belma; MEDANHODŽIĆ-VUK, Saira a SOBER, Miroslav. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. Online. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2018, roč. 4, č. 2, s. 5-9. ISSN 1840-4812. Dostupné z: <https://doi.org/10.17305/bjbms.2004.3405>.

[93] SNYDER, Lloyd R. *Introduction to modern liquid chromatography*. 2. ed. New York: John Wiley, 1979. ISBN 0-471-03822-9.

[94] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.

[95] Bieri, J. G., Poukka, R. K., & Prival, E. L. (1970). Determination of alpha-tocopherol in erythrocytes by gas-liquid chromatography. *Journal of lipid research*, 11(2), 118–123.

[96] MOLDOVEANU, Serban C. a DAVID, Victor. *Essentials in Modern HPLC Separations*. Online. Waltham, MA: Elsevier, 2013. ISBN 9780123850133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-65748-8>.

[97] chrome-
extension://efaidnbmnnnibpcajpcgglefindmkaj/https://www.fda.gov/media/161201/download

[98] NAVALE, Archana Mohit; PATEL, Vichika R. a TANDEL, Falguni B. Chromatographic method for estimation of vitamin E from dried blood spot sample. Online. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020, roč. 6, č. 1. ISSN 2314-7253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00025-1>.

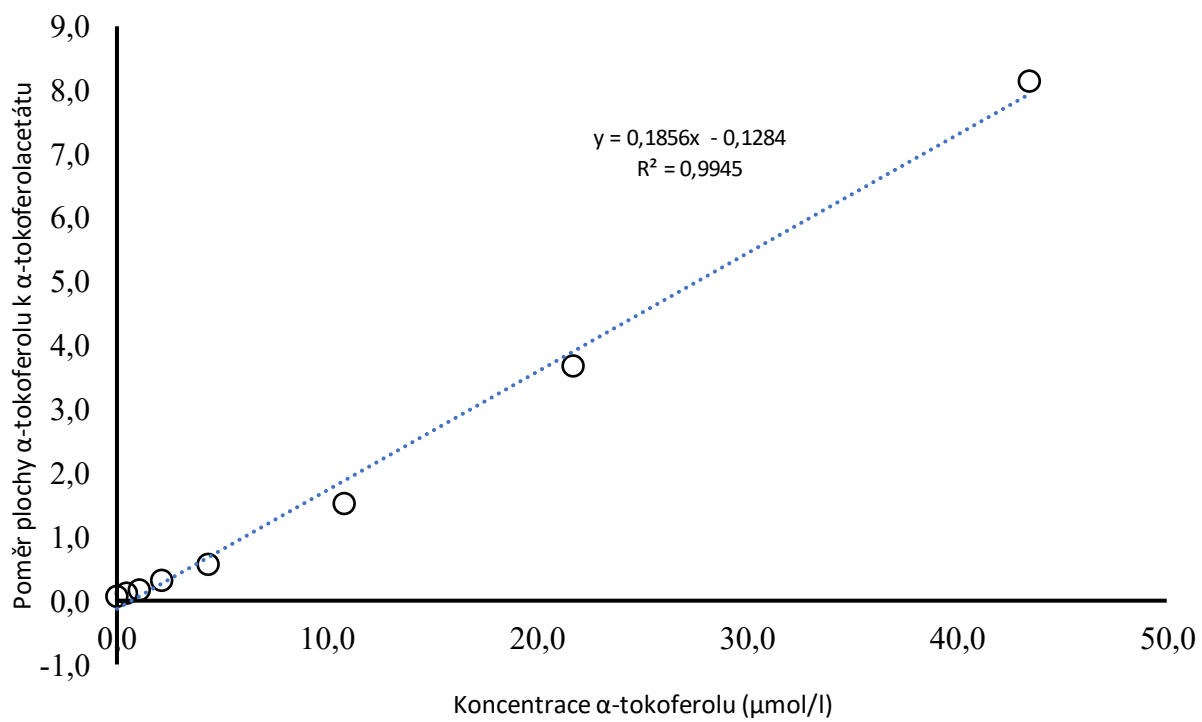
[99] KOPČIL, Michal; JANEČEK, Radim; KANĎÁR, Roman a ADAM, Martin. *Determination of α -tocopherol in different biological samples by GC-MS without derivatization*. 2022-09-21T07:15:48Z. ISSN 1211-5541. Dostupné také z: <https://hdl.handle.net/10195/80395>.

[100] HALL, Elizabeth; FLORES, Sharon a DE JESÚS, Víctor. Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. Online. *International Journal of Neonatal Screening*. 2015, roč. 1, č. 2, s. 69-78. ISSN 2409-515X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijns1020069>.

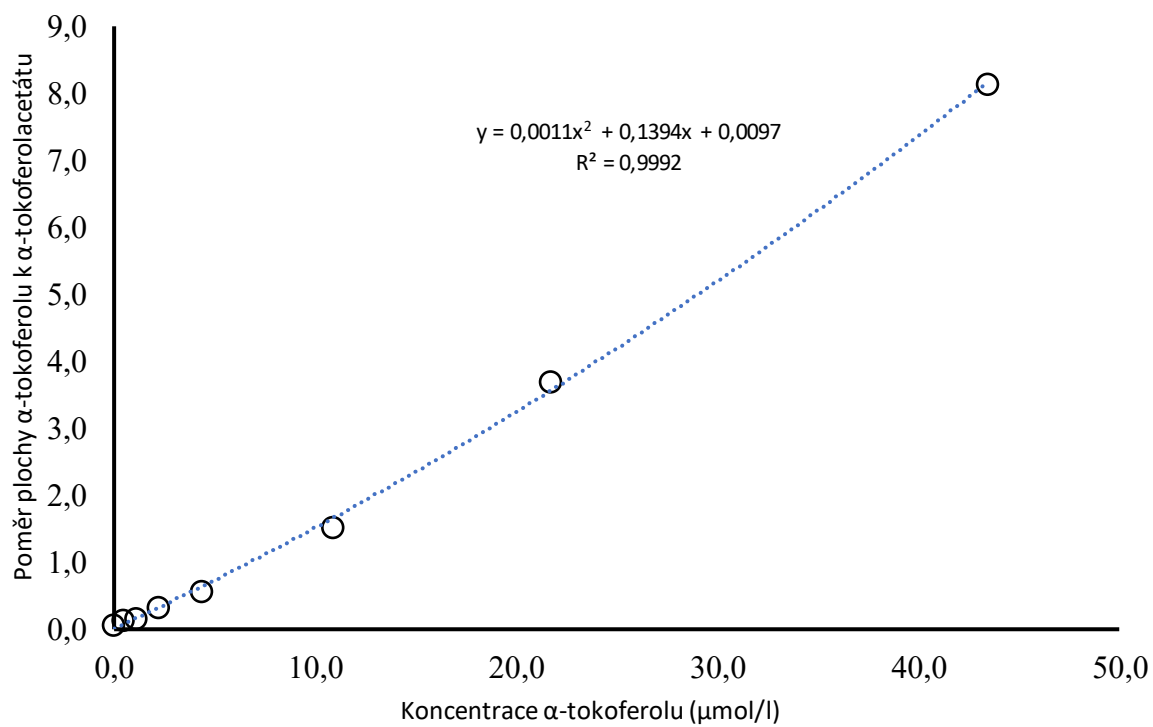
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferolacetát, lineární závislost	68
Příloha 2 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferolacetát, kvadratická závislost	69
Příloha 3 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferol-D ₆ , lineární závislost	70
Příloha 4 Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu-D ₆ (5,56 min), α -tokoferolu (5,64 min) a α -tokoferolacetátu (6,26 min) ve směsném standardu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	71
Příloha 5 Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí	71
Příloha 6 Hmotnostní spektrum α -tokoferolu.....	72
Příloha 7 Hmotnostní spektrum α -tokoferolu-D ₆	72
Příloha 8 Hmotnostní spektrum α -tokoferolacetátu.....	72

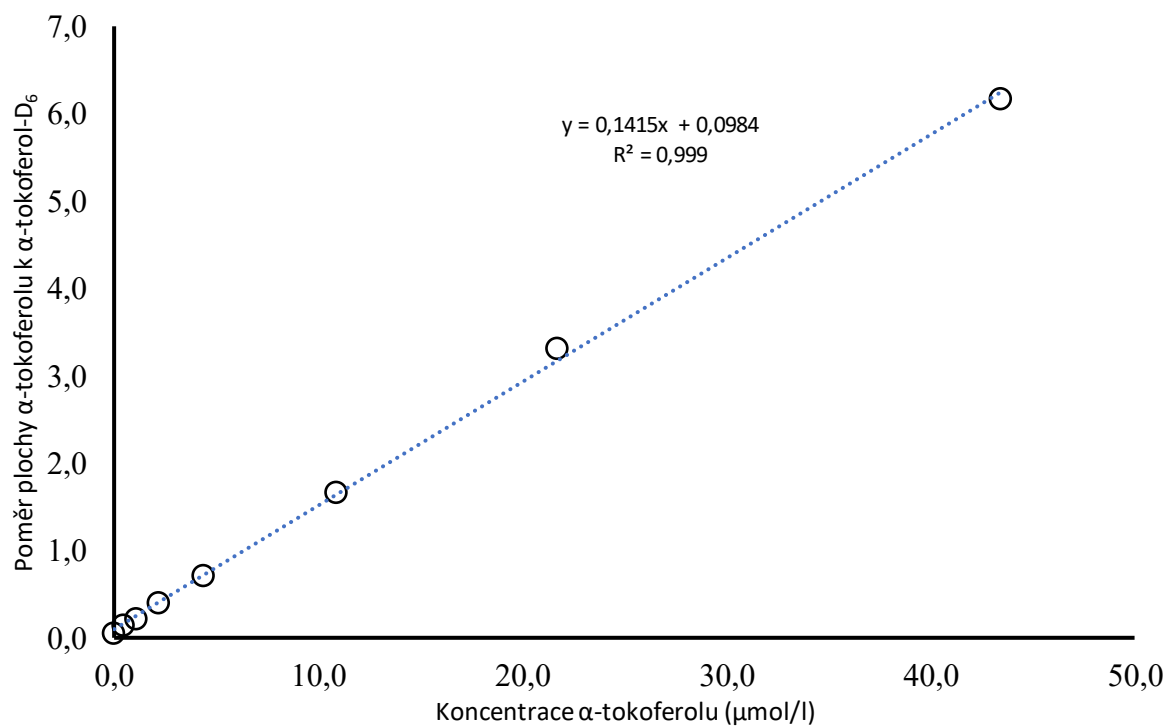
Příloha 1 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferolacetát, lineární závislost



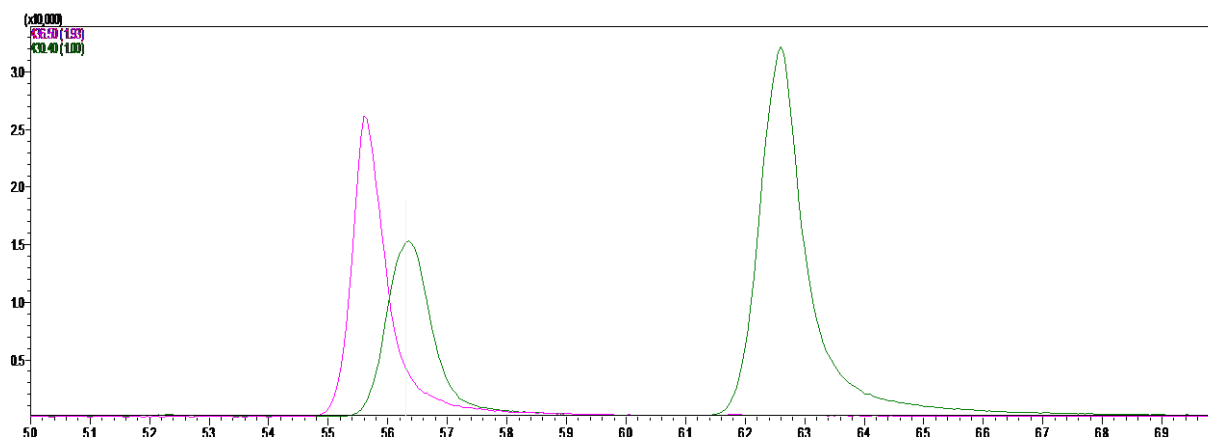
Příloha 2 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferolacetát, kvadratická závislost



Příloha 3 Stanovení α -tokoferolu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, kalibrační křivka, vnitřním standardem byl α -tokoferol-D₆, lineární závislost

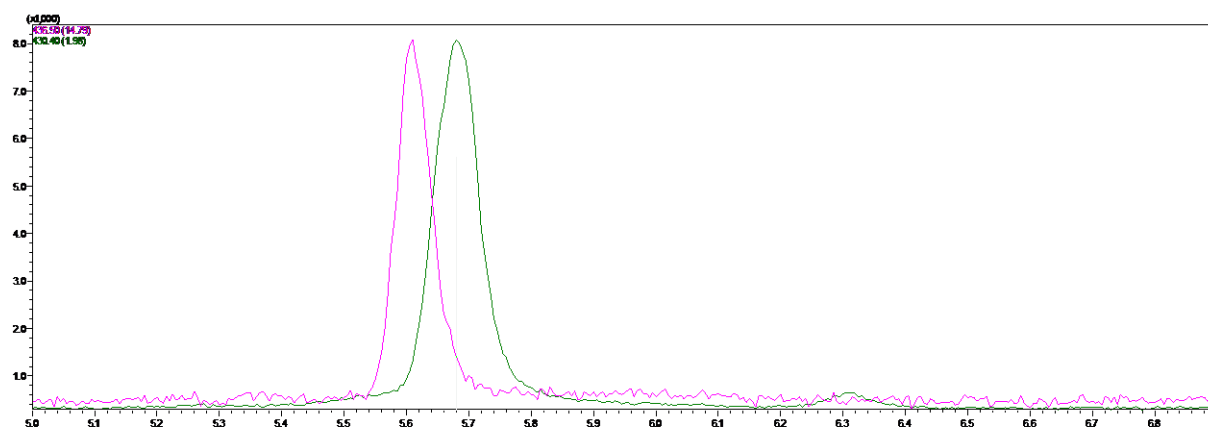


Příloha 4 Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu-D₆ (5,56 min), α -tokoferolu (5,64 min) a α -tokoferolacetátu (6,26 min) ve směsném standardu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí



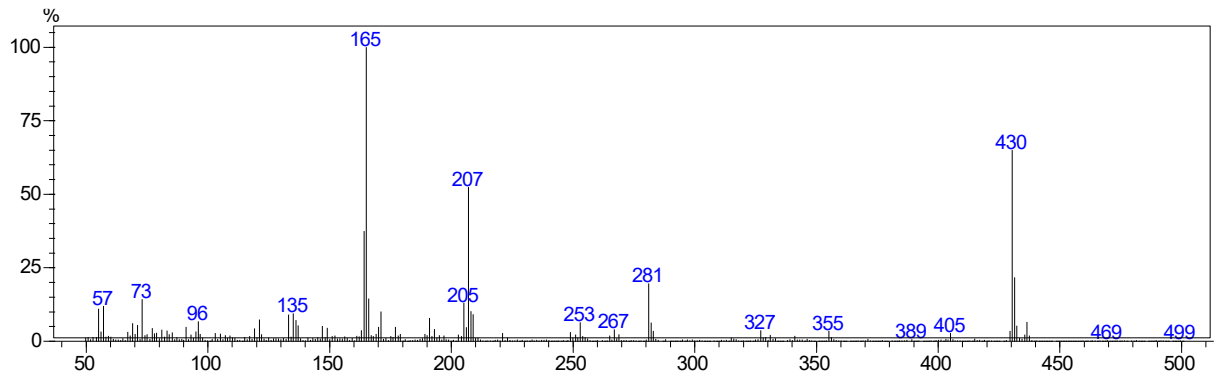
GC–MS podmínky: kolona HP–5ms [(5%-fenyl)-methylpolysiloxan; 30 m × 0,32 mm, tloušťka filmu 0,25 μ m nosný plyn: helium; celkový průtok nosného plynu: 6,9 ml/min; průtok nosného plynu kolonou: 1,3 ml/min; dávkovaný objem vzorku: 1 μ l, mód split (2); teplota kolony: 280 °C (isotermická separace); teplota nástřiku: 280 °C; typ ionizace: dopadem elektronu (70 eV); režim měření: SIM; monitorované ionty: m/z 430 pro α -tokoferol; m/z 436 pro α -tokoferol-D₆; teplota rozhraní: 200 °C; teplota iontového zdroje: 280 °C.

Příloha 5 Chromatografický záznam stanovení α -tokoferolu v lidské krvi získané technikou suché kapky metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí

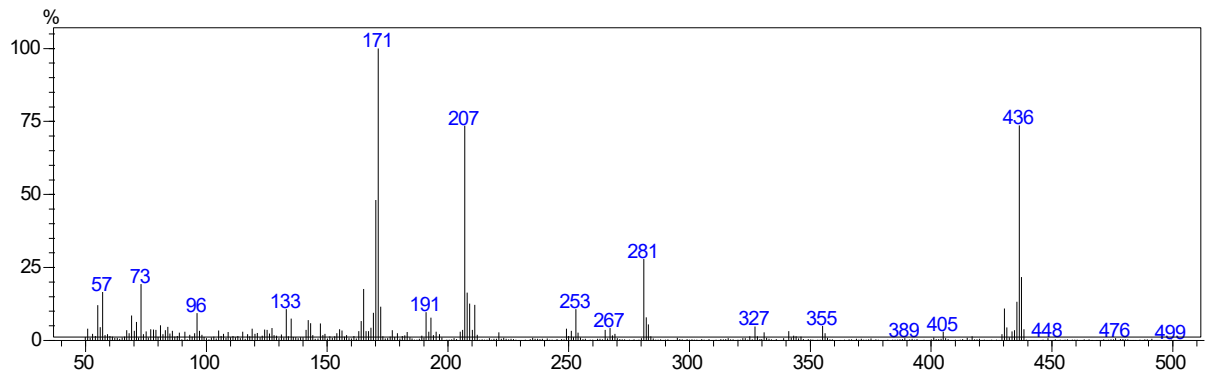


Pík 1, α -tokoferol-D₆ (5,60 min); pík 2, α -tokoferol (5,68 min; 2,29 μ mol/l). Podmínky GC–MS: viz příloha 4.

Příloha 6 Hmotnostní spektrum α -tokoferolu



Příloha 7 Hmotnostní spektrum α -tokoferolu-D₆



Příloha 8 Hmotnostní spektrum α -tokoferolacetátu

