

Chromatografické stanovení vitamínu E pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie

Bc. Lenka Jelínková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka JELÍNKOVÁ**
Osobní číslo: **T08800**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Chromatografické stanovení vitamínu E pomocí
vysoce účinné kapalinové chromatografie**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Fyziologie vitamínu E.
- Popis vysoce účinné kapalinové chromatografie.

II. Praktická část

- Metodika stanovení vitamínu E.
- Stanovení vitamínu E v obilovinách.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VÁVROVÁ, J. Vitaminy a stopové prvky 2007, Česká společnost klinické biochemie, Pardubice 2007.

[2] SVAČINA Š. Klinická dietologie, Grada Publishing, Praha 2008.

[3] KOPÁČOVÁ, O. Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 2007.

[4] HELÁN, V. Analýza organických látek, 2 THETA, Český Těšín 2005.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Daniela Kramářová, Ph.D.

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: JELÍNKOVÁ LENKA.....

Obor: THEVP.....

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 12.5.2010.....

Jelínková.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na izolaci vitamínu E a jeho stanovení vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Tento v tucích rozpustný vitamin je významným antioxidantem. Byly vyzkoušeny možnosti jeho izolace a nalezeny optimální chromatografické podmínky pro jeho analýzu. Bylo stanoveno jeho množství ve vybraných vzorcích obilovin a získané hodnoty byly porovnány s publikovanými údaji.

Klíčová slova: vitamin E, HPLC, obiloviny

ABSTRACT

This master thesis is focused on isolation of vitamin E and its determination by high-performance liquid chromatography. This fat-soluble vitamin is an important antioxidant. Possibilities of its isolation were tested and optimum chromatographic conditions for its analysis were found. Its quantity was determined in selected samples of cereals and the obtained values were compared with literature.

Keywords: vitamin E, HPLC, cereals

Tímto bych ráda poděkovala Ing. et Bc. Daniele Kramářové, PhD. za poskytnutí cenných rad a odborné vedení při vypracovávání diplomové práce. Děkuji i své rodině za podporu během studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 VITAMINY	13
2 VITAMIN E	14
2.1 STRUKTURA.....	14
2.2 FYZIKÁLNĚ - CHEMICKÉ VLASTNOSTI	15
2.3 FUNKCE.....	17
2.4 ZDROJE.....	19
2.5 NEDOSTATEK A NADBYTEK	20
2.6 DOPORUČENÁ DÁVKA.....	21
2.7 ÚČINKY	21
2.8 ZTRÁTY	22
2.9 VITAMINOVÉ DOPLŇKY STRAVY	22
3 BIOPOTRAVINY	23
3.1 SYSTÉM KONTROLY	23
3.2 OZNAČOVÁNÍ	23
3.3 PRODUKCE A VÝROBA	24
4 OBILOVINY	25
4.1 MORFOLOGICKÁ STAVBA ZRNA	25
4.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ	26
4.3 PRODUKCE	27
5 CHROMATOGRRAFIE	29
5.1 ROZDĚLENÍ CHROMATOGRAFICKÝCH METOD	29
5.2 VYSOCE ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	30
5.3 ZÁKLADNÍ POJMY	31
5.4 INSTRUMENTACE PRO HPLC	32
5.4.1 Zásobníky mobilní fáze	33
5.4.2 Čerpadla mobilní fáze	34
5.4.3 Dávkovací zařízení.....	34
5.4.4 Kolony	35
5.4.5 Náplně kolon	36
5.4.6 Prodloužení životnosti HPLC kolon	36
5.4.7 Detektory	37
5.4.8 Mobilní fáze	39
5.4.9 Základní aplikace HPLC	40
II PRAKTICKÁ ČÁST	41

6	METODIKA	42
6.1	CHEMIKÁLIE	42
6.2	POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	42
6.3	VZORKY OBILOVIN	43
6.3.1	Kamut	44
6.3.2	Špaldové kernotto (velké kroupy)	45
6.3.3	Grünkern.....	46
6.3.4	Špalda loupaná	47
6.4	OPTIMALIZACE PŘI TESTOVÁNÍ IZOLAČNÍHO POSTUPU	48
6.4.1	Soxhletova extrakční metoda	48
6.4.2	Extrakce pod zpětným chladičem.....	48
6.4.3	Extrakce ve vodní lázni	48
6.5	MODELACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO ANALÝZU VITAMINU E	49
6.5.1	Testování rozpustnosti standardu	49
6.5.2	Vlastní měření na koloně Supelcosil LC 8.....	49
6.5.3	Vlastní měření na koloně Ascentis C 18	50
6.5.4	Vlastní měření na koloně Supelcosil LC 18 DB	50
6.5.5	Vlastní měření na koloně Discovery C 18.....	50
6.6	KALIBRAČNÍ KŘIVKA	51
6.7	STANOVENÍ VITAMINU E VE VYBRANÝCH VZORCÍCH OBILOVIN	51
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	53
7.1	VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ IZOLAČNÍHO POSTUPU	53
7.1.1	Výsledky Soxhletovy extrakční metody	53
7.1.2	Výsledky extrakce pod zpětným chladičem	53
7.1.3	Výsledky extrakce ve vodní lázni.....	53
7.2	VÝSLEDKY MODELACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK PRO ANALÝZU VITAMINU E.....	54
7.2.1	Výsledky testování rozpustnosti standardu	54
7.2.2	Výsledky měření na koloně Supelcosil LC 8	54
7.2.3	Výsledky měření na koloně Ascentis C 18.....	54
7.2.4	Výsledky měření na koloně Supelcosil LC 18 DB.....	54
7.2.5	Výsledky měření na koloně Discovery C 18	55
7.3	VÝSLEDKY MĚŘENÍ KALIBRACE VITAMINU E.....	55
7.4	VÝSLEDKY STANOVENÍ VITAMINU E VE VYBRANÝCH VZORCÍCH OBILOVIN	62
7.4.1	Stanovení vitamínu E ve vzorcích získaných Soxhletovou extrakční metodou	62
7.4.2	Stanovení vitamínu E ve vzorcích získaných extrakcí ve vodní lázni	62
	ZÁVĚR	69
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	79
	SEZNAM OBRÁZKŮ	81
	SEZNAM TABULEK.....	82

SEZNAM PŘÍLOH.....	83
---------------------------	-----------

ÚVOD

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny nezbytné pro řadu funkcí lidského organismu. Po chemické stránce se jedná o velmi rozmanité látky, které jsou různě citlivé na vnější vlivy. V potravinách se vyskytují v nízkých koncentracích. Lidský organizmus si, až na některé výjimky, nedokáže vitaminy sám vyrobit, a proto je musí získávat prostřednictvím stravy. Nedostatečný, ale i nadbytečný přísun vitaminů může způsobit řadu zdravotních problémů.

Vitamin E je souhrnný název pro osm derivátů tokoferolu a tokotrienolu. Jejich biologická aktivita je různá. Nejběžnější a zároveň neúčinnější formou je α -tokoferol. Vitamin E se v potravě nachází rozpuštěný v tucích, ze kterých se uvolňuje a vstřebává v tenkém střevě. Je vysoce účinným antioxidantem a chrání buněčné membrány před volnými radikály. Podporuje také nervový systém a syntézu DNA, chrání před vznikem aterosklerózy a napomáhá hojení ran. Hlavními zdroji vitaminu E jsou rostlinné oleje, obilné klíčky a ořechy. Jeho nedostatek se může projevit neurologickými potížemi, poruchami plodnosti, sníženou obranou organismu před volnými radikály nebo zvýšeným rizikem kardiovaskulárních chorob. Mezi nežádoucí účinky nadbytečného příjmu patří gastrointestinální potíže, únava, bolesti hlavy či svalová slabost. Přímá toxicita nebyla popsána.

Obiloviny jsou jednou za základních potravin důležitých pro lidskou výživu. Jsou zdrojem cenných látek, zejména vlákniny, vitaminů a minerálních látek. Pravidelná konzumace potravin obsahujících celá zrna příznivě ovlivňuje zdraví člověka.

Vysoce účinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. Mezi hlavní výhody jejího použití patří vysoká rychlost, účinnost a citlivost analýzy, snadná reprodukovatelnost měření a možnost automatického vyhodnocení naměřených dat. Kapalinový chromatograf umožňuje analýzu iontů, látek polárních i nepolárních, málo těkavých, tepelně nestabilních i vysokomolekulárních.

Cílem této diplomové práce bylo nalézt optimální izolační postup vitaminu E ze vzorků obilovin, zjistit chromatografické podmínky pro jeho analýzu a kvantitativně stanovit jeho obsah v obilovinách pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VITAMINY

Vitaminy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny různých chemických vlastností, které jsou v nepatrném množství nezbytné pro řadu důležitých biochemických a fyziologických funkcí lidského organismu [1].

V potravinách se vyskytují v nízkých koncentracích a většina z nich je velmi citlivá na nejrůznější fyzikální a chemické vlivy [2].

Organismus získává převážnou část vitaminů z potravy. Některé vitaminy vznikají činností bakterií žijících v tlustém střevě člověka, odkud se vstřebávají do krve (hlavně vitamin K) [3]. Jiné vitaminy jsou potravou přijímány ve formě provitaminů, což jsou inaktivní prekurzory, které se v organismu mění na vlastní účinnou látku (změna β -karotenu na vitamin A) [4].

Vitaminy neslouží ke krytí energetických nároků organismu, ani nejsou stavebními nebo strukturními jednotkami [5]. Mnohé z nich se podílejí na katalyzovaných reakcích tím, že se jako kofaktory stávají součástí molekul enzymů. Další zase působí jako antioxidanty, které chrání buněčné struktury před oxidací [6].

Nedostatečný přívod vitaminů, který může být podložen deficitem v potravě, nevyhovujícím rozsahem střevní absorpce, nefunkční střevní flórou nebo poruchou vnitřní biotransformace, vyvolá po čase hypovitaminózu a v těžkém stavu avitaminózu, kdy může dojít až ke smrti organismu [5, 6]. Nadbytek vitaminů se označuje jako hypervitaminóza, která se většinou objevuje ve spojitosti s nadměrným přísunem vitaminů prostřednictvím doplňků stravy [7].

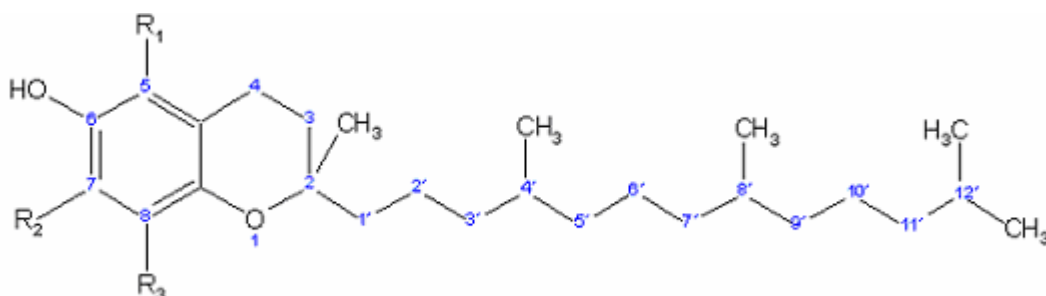
Rozlišovacím znakem vitaminů je jejich rozpustnost, podle níž je lze rozdělit na vitaminy rozpustné v tucích (lipofilní) a vitaminy rozpustné ve vodě (hydrofilní) [8]. Lipofilní vitaminy se vstřebávají pouze v případě, že probíhá trávení a vstřebávání tuků a jejich zásobárnou jsou především játra. Hydrofilní vitaminy nejsou organismem ukládány do zásoby a jejich přebytek je vylučován močí. [3]. Mezi vitaminy rozpustné v tucích patří vitamin A, D, E a K. Vitaminy rozpustné ve vodě jsou vitamin C, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₁₂, biotin a kyselina listová [9].

2 VITAMIN E

V roce 1922 pozorovali američtí vědci Herbert M. Evans a Katherine J. Scott Bishop při pokusu na krysách krmených hlavně sádlem poruchu rozmnožování. Schopnost reprodukce se plně obnovila přidávkem semen olejnin do jejich potravy. Neznámá účinná látka byla nazvána antisterilitním faktorem a v roce 1924 pojmenována vitamin E [10, 11]. Roku 1936 byl vitamin E izolován z oleje z pšeničných klíčků, o dva roky později byla stanovena jeho chemická struktura a laureát Nobelovy ceny švýcarský chemik Paul Karrer poprvé syntetizoval D,L- α -tokoferol [12, 13, 14].

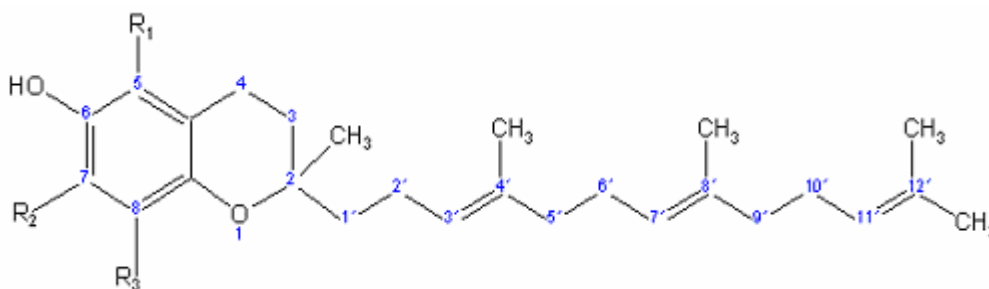
2.1 Struktura

Vitamin E je souhrnný název pro tokoferoly a tokotrienoly náležící k řadě derivátů 6-chromanolu substituovaných nasycenými (tokoferoly) nebo částečně nasycenými (tokotrienoly) izoprenoidy s postranními řetězci a jednou až třemi metylovými skupinami v aromatickém skeletu [1]. Základní látkou je α -tokoferol, ale v přírodních materiálech se vyskytuje i β -tokoferol, γ -tokoferol, δ -tokoferol a jim příbuzné α -, β -, γ - a δ -tokotrienoly [7].



$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = H$	tokol		
$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = CH_3$	α -tokoferol	5,7,8-trimetyltokol	$C_{29}H_{50}O_2$
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = CH_3$	β -tokoferol	5,8-dimetyltokol	$C_{28}H_{48}O_2$
$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = CH_3$	γ -tokoferol	7,8-dimetyltokol	$C_{28}H_{48}O_2$
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = CH_3$	δ -tokoferol	8-metyltokol	$C_{27}H_{45}O_2$

Obr. 1 Tokoferoly [15]



$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = H$	tokotrienol		
$R_1 = CH_3$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = CH_3$	α -tokotrienol	5,7,8-trimetyltrienol	$C_{29}H_{44}O_2$
$R_1 = CH_3$	$R_2 = H$	$R_3 = CH_3$	β -tokotrienol	5,8-dimetyltrienol	$C_{28}H_{42}O_2$
$R_1 = H$	$R_2 = CH_3$	$R_3 = CH_3$	γ -tokotrienol	7,8-dimetyltrienol	$C_{28}H_{42}O_2$
$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = CH_3$	δ -tokotrienol	8-metyltrienol	$C_{27}H_{43}O_2$

Obr. 2 Tokotrienoly [15]

Jednotlivé tokoferoly nemají stejnou biologickou účinnost. Nejvyšší biologickou aktivitou se vyznačuje α -tokoferol [1, 8]. Účinnost se snižuje s klesajícím počtem metylových skupin v pořadí α - > β - > γ - > δ -tokoferol v poměru 100 : 40: 5 až 8 : 1 [5, 8].

V přírodě existuje několik forem přirozených tokoferolů. Molekuly dvou hlavních jsou si vzájemně zrcadlovým obrazem a označují se jako D a L. Hlavní forma vitamínu E má konfiguraci molekuly D (D- α -tokoferol). Syntetický vitamin E je směsí forem D a L (např. D,L- α -tokoferol), avšak L forma brání vstupu D formy do buněk a jejímu využití [16].

Biologická aktivita vitamínu E přírodního původu je vyšší než aktivita synteticky vyrobených forem. Bylo zjištěno, že mozek, mícha, plíce, červené krvinky a krevní plazma dávají přednost přírodnímu vitamínu E. Poměr plazmatické koncentrace nativního vitamínu E je ve srovnání se syntetickou formou 2 : 1 [17].

2.2 Fyzikálně - chemické vlastnosti

Všechny deriváty vitamínu E jsou za normální teploty téměř bezbarvé nebo jen slabě žluté viskózní oleje [8, 18]. Mají silné redukční vlastnosti, jsou relativně stabilní i při zvýšené teplotě a v alkalickém prostředí. Oxidace je však iniciována v alkalických podmínkách

za přístupu vzduchu v přítomnosti iontů kovů [1]. Jejich citlivost na kyslík stoupá s počtem metylových skupin v molekule. Stabilita je vyšší, jsou-li ve formě esterů [8]. Vitamin E poškozují a ničí anorganické soli železa [19, 20].

Tokoferoly a tokotrienoly absorbují světlo (292 - 295 nm), jsou přirozenými fluorescenty (excitace 205 - 295 nm, emise 330 nm) a mohou být elektrochemicky oxidovány. Možnost fluorescence a elektrochemické oxidace nemá α -tokoferolacetát, u něhož je fenolická hydroxylová skupina blokována [1].

V potravě se vitamin E vyskytuje rozpuštěný v tucích. Z nich se uvolňuje a následně resorbuje během jejich štěpení v tenkém střevě, konkrétně ve dvanáctníku a lačníku [9]. Odtud je vstřebán přibližně z 35 % [1]. Účinnost vstřebávání závisí na povaze tuku, nasycené mastné kyseliny absorpci podporují, zatímco nenasycené ji mohou i inhibovat [7].

Vitamin E nemá při přenosu z gastrointestinálního traktu specifický bílkovinný nosič, ale je transportován tukovými částicemi - chylomikrony, které vznikají ve střevní stěně a lymfatickou cestou jsou dopravovány do krevního oběhu. Když je vitamin E zachycen se zbytky chylomikronů v játrech, je zabudován do lipoproteinů o velmi nízké hustotě (VLDL - Very Low Density Lipoprotein), nízké hustotě (LDL - Low Density Lipoprotein) a vysoké hustotě (HDL - High Density Lipoprotein). Poté z těchto lipoproteinů přechází do buněčných membrán, kde plní svoji roli [21]. Vitamin E může být též absorbován přes kůži a sliznice [22].

V těle se skladuje po dobu 6 až 12 měsíců uložen zejména v játrech, depotním tuku, svalech, varlatech, děloze, krvi a nadledvinkách [23, 24]. Nejčastěji je koncentrace vitaminu E v lidském těle určována z krve, u dospělých by se měla pohybovat v rozmezí 5,5 až 17 mg.l⁻¹ [17, 25].

Tab. 1 Koncentrace vitamínu E u člověka [17, 26]

Tkáně	mg.g ⁻¹ čerstvé váhy
Tukové tkáně	150,0
Játra	13,0
Nadledviny	132,0
Vaječníky	11,0
Hypofýza	40,0
Plazma	9,5
Varlata	40,0
Děloha	9,0
Trombocyty	30,0
Ledviny	7,0
Srdce	20,0
Erytrocyty	2,3
Svalová tkáň	19,0

Exkrece vitamínu probíhá ze 70 - 80 % játry a z 20 - 30 % močí (kyselina tokoferolová a γ -laktoglukuronidy) [1].

2.3 Funkce

Základní metabolickou funkcí vitamínu E je jeho působení jako přirozený antioxidant a „scavenger“ (lapač) reaktivních metabolitů kyslíku. Tokoferol v těle snadno podléhá oxidaci na chinoidní strukturu a tím brání oxidaci jiných látek. Jeho ochranný účinek se uplatňuje na nenasycených mastných kyselinách membránových fosfolipidů a také na LDL lipoproteinech. Tokoferol snižuje rozsah lipoperoxidace, ale jeho nedostatek je naopak spojen s nadměrnou tvorbou peroxidů, s poškozením membrán a vyplavováním lysozomálních enzymů do krve [27].

Vitamin E podporuje syntézu DNA a RNA, je nezbytný pro fyziologickou stavbu a funkci nervového systému, chrání játra před potencionálním vlivem organických rozpouštědel. Dále vitamin E inhibuje mutageny v gastrointestinálním traktu a chrání erytrocyty před hemolýzou [3]. V lidském těle zvyšuje odolnost vnitřních stěn tepen vůči vápenatým usazeninám, chrání tak před vznikem aterosklerózy. Také napomáhá procesu hojení ran a brání vzniku velkých jizev [30]. Vitamin E zlepšuje účinnost inzulínu, napomáhá rozpouštění krevních sraženin, podporuje funkci imunitního systému a zvyšuje odolnost organismu vůči stresu a infekcím [16]. Preventivně působí proti rakovině a samovolnému potratu, chrání společně s vitaminem A plíce před exhaláty, snižuje krevní tlak i riziko vzniku šedého zákalu a náhlých mozkových příhod, brání vzniku svalových křečí a „přispívá k mladistvému vzhledu“ [31]. Vitamin E brání autooxidaci vitamínu A a karotenu [6]. Účinek vitamínu E je podporován přítomností dostatečného množství vitamínu C a selenu v organismu [4].

2.4 Zdroje

Hlavním zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje, zejména slunečnicový, bavlníkový, lněný, sojový, kukuřičný, arašídový, kokosový, palmový či olej z obilných klíčků, ze kterého se připravují koncentráty přirozených tokoferolů [32]. Dále se ve větším množství vyskytuje v jádrech ořechů, kukuřici, hrášku, ovesné mouce a máku. Menší množství se nachází i v arašídech, avokádu, hlávkovém salátu, celeru, cizrně a fazolích. Je přítomen také v bylinách jako je vojtěška, pampeliška, kopřiva či malinový list. Z živočišných produktů obsahují vitamin E především mléko, vejce a máslo. Na rozdíl od vitaminů A a D není ve větším množství přítomen v rybím tuku [19, 32, 33].

Tab. 2 Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách [30]

Potravina [100 g]	Obsah vitamínu E [mg]	Potravina [100 g]	Obsah vitamínu E [mg]
Olej z pšeničných klíčků	174,48	Slunečnicová jádra	21,80
Mandlový olej	62,53	Vlašský ořech	6,04
Slunečnicový olej	40,00	Cizrna, sušená	5,83
Majonéza 80 % tuku	15,00	Rýžová mouka	10,00
Úhoř říční	5,60	Žitné klíčky	12,60
Fenykl	6,00	Pšeničné klíčky	24,74
Černý kořen, vařený	5,00	Sójové boby	13,30
Paprika, syrová	2,50	Tuňák v oleji	9,05
Šípky, čerstvé	4,21	Krocan	2,50
List petržele, syrový	3,70	Vepřová játra	0,60
Sladké brambory	4,00	Kaviár, pravý	10,00
Burské ořechy, čerstvé	10,96	Kvasnicové vločky	3,60
Lískové oříšky	26,29	Žitný chléb	1,09
Lněná semena, neloupaná	57,00	Vejce slepičí	2,02
Mandle	26,12	Máslo	2,02

2.5 Nedostatek a nadbytek

Deficit vitamínu E může vzniknout při poruchách absorpce tuků, ke kterým dochází po chirurgickém odstranění části střeva nebo při chorobách jater. Rizikovými skupinami jsou i předčasně narozené děti, pacienti s dědičnými chorobami krve (srpkovitá anémie, talasemie) či nemocní se selháním ledvin, kteří jsou léčeni hemodialýzou [16].

Snížené sérové koncentrace vitamínu E mohou být také zaznamenány jako průvodní jev celiakie, chronické pankreatidy, nádoru pankreatu nebo cystické fibrózy. Sérové koncentrace mohou být sníženy i při užívání některých léků jako jsou fenytoin při léčbě epilepsie nebo klofibrát, což je lék snižující hladinu tuků v krvi [1].

Nedostatek vitamínu E se může projevit jako hemolytická anémie, snížená životnost

erytrocytů, zvýšená agregabilita trombocytů, morfologické a funkční změny periferních nervů, poruchy plodnosti, snížená obrana organismu před volnými radikály, zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob, cerebrovaskulárních nemocí a Alzheimerovy choroby [1, 25].

Přímá toxicita popsána není, pouze nežádoucí účinky. Mezi ně patří gastrointestinální potíže, únava, bolesti hlavy, svalová slabost. Významné jsou koagulační defekty (se současným deficitem vitamínu K). U těhotných žen může předávkování vyvolat poškození plodu [1].

2.6 Doporučená dávka

Určení denní dávky vitamínu E je vzhledem ke značné šíři projevů jeho biologické aktivity dosti obtížné. Hodnoty doporučených dávek se v jednotlivých zemích liší [2]. Výživová doporučená dávka vitamínu E pro průměrného obyvatele ČR je $12 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ [34]. Nejvyšší tolerovaná dávka pro dospělého člověka byla stanovena na $1000 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ [16]. Potřebnou denní dávku přivádí téměř výhradně rostlinná potrava, výjimkou je mléko [6]. Potřeba vitamínu E se zvyšuje při konzumaci potravin s vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin [23, 35, 36]. Zvýšený příjem je žádoucí také u těhotných a kojících žen, při aplikaci ionizujícího záření a léčbě cytostatiky [1].

2.7 Účinky

Terapeuticky se vitamin E podává v dávce $100 - 200 \text{ mg} \cdot \text{den}^{-1}$ při léčbě infertility, při atrofii sliznic, neurastenii, degeneraci kloubů a onemocnění kůže, při malabsorpci, dlouhodobé parenterální výživě, myopatiích, cystické fibróze a dietě s redukcí příjmu lipidů se současnou suplementací polynenasycených mastných kyselin [1, 25].

Podávání vitamínu E společně se zinkem ženám během těhotenství vedlo k významně nižšímu výskytu známek astmatu u jejich dětí ve věku do 5 let [37, 38].

Vitamin E se běžně přidává jako antioxidant do olejů, margarínů a ostatních potravin, které obsahují tuky [39]. Účinky vitamínu E využívá i kosmetický průmysl při výrobě pleťových krémů a mastí zvyšujících schopnost horní vrstvy pokožky udržovat vlhkost. Dále se přidává do krémů na opalování, kde chrání pokožku před nadměrným působením slunečního záření [30].

2.8 Ztráty

Při běžných způsobech kulinárního a průmyslového zpracování potravin je vitamin E v nepřítomnosti kyslíku a oxidovaných lipidů poměrně stabilní. Při pasteraci mléka jsou ztráty asi 5 %. Při skladování obilí činí úbytek asi 10 % za měsíc. K největším ztrátám dochází při smažení a pečení. V tucích používaných opakovaně pro smažení potravin se tokoferoly prakticky nevyskytují, stejně tak jako ve smažených a mrazírensky skladovaných výrobcích (předsmažené bramborové hranolky). Obsah vitamínu postupně klesá i při mrazírenském skladování potravin obsahujících vyšší množství polyenových mastných kyselin. Při sušení ovoce a zeleniny dochází ke ztrátám 50 - 70 % vitamínu [18]. Množství vitamínu E v potravinách se zmenšuje i při použití kuchyňského náčiní, které obsahuje železo a měď [22].

Při rafinaci olejů dochází ke snížení obsahu vitamínu na 10 - 50 % původního obsahu. K hlavním ztrátám dochází během odkyselování a bělení. Při deodoraci jsou ztráty způsobeny především těkáním s vodní parou za sníženého tlaku. Při hydrogenaci tuků za použití niklových katalyzátorů činí ztráty vitamínu 30 - 50 % [18].

2.9 Vitaminové doplňky stravy

Komerční vitaminové přípravky často obsahují estery α -tokoferolu, které jsou stálejší vůči oxidaci ve srovnání s volným α -tokoferolem [16, 18, 40]. Vitamin E patří mezi potravní doplňky, které jsou povoleny k obohacování potravin. Může být přidáván ve formě D- α -tokoferolu, D,L- α -tokoferolu, D- α -tokoferolacetátu, D,L- α -tokoferolacetátu nebo D- α -sukcinátu kyseliny tokoferolové [41].

3 BIOPOTRAVINY

Biopotraviny jsou potraviny vyrobené z kontrolovaných a certifikovaných produktů ekologického zemědělství [42]. Znamená to, že jsou vyrobeny z rostlin, živočichů a jejich produktů pěstovaných, chovaných a zpracovaných podle Zákona o ekologickém zemědělství č. 242/2000 Sb. a Nařízení rady EHS č. 2092/91. Biopotraviny musí také splňovat všechny požadavky na bezpečnost a zdravotní nezávadnost podle Zákona o potravinách č. 110/1997 Sb. [43].

3.1 Systém kontroly

Dozor nad dodržováním požadavků legislativy vykonává Ministerstvo zemědělství prostřednictvím třech kontrolních organizací: KEZ o.p.s., ABCERT GmbH a BIOKONT CZ, s.r.o. Tyto organizace zároveň vydávají certifikáty osvědčující původ výrobků [44].

3.2 Označování

Pravé certifikované biopotraviny jsou označeny bioznačkou, tzv. biozebrou, a na jejich obalu musí být uveden nápis „Produkt ekologického zemědělství“. Dále má označení biopotravin obsahovat identifikační kód kontrolního orgánu. V souvislosti s bioprodukty se smí užívat výrazy jako biologický, organický, ekologický anebo předpony bio a eko [44].



Obr. 5 Biozebra [45]



Obr. 6 Evropské bio logo [45]

3.3 Produkce a výroba

Při produkci a výrobě biopotravin je nutné používat šetrné postupy způsobující minimální fyzikální, chemické a biologické změny. Je zakázáno bělení, hydrogenace, působení hormonů, uzení s užitím zakázaných chemických látek, ozařování, mikrovlnný ohřev a využívání geneticky modifikovaných organismů [46].

Biopotraviny nesmí obsahovat syntetická barviva, aromatické a konzervační látky, ochucovadla, emulgátory, umělá sladidla, oxid siřičitý (s výjimkou vína) a další cizorodá aditiva, která zvyšují zdravotní rizika potravin nebo zatěžují či znečišťují životní prostředí [42, 47].

Je prokázáno, že biopotraviny mají lepší výživovou hodnotu, zejména vyšší obsah vitaminů C a E a více minerálních látek. Ekologicky vypěstovaná zelenina má nižší obsah dusičnanů až o 50 % a nižší obsah pesticidů o více než 90 % v porovnání s konvenční zeleninou.

Sortiment českých biopotravin zahrnuje zejména mléko a mléčné výrobky, cereálie, mouku, pečivo, těstoviny, čaj, koření, vejce, vepřové a hovězí maso, ovoce, zeleninu, víno a dětskou výživu.

V České republice je státní podpora ekologických zemědělců i výrobců biopotravin řešena v rámci Programu rozvoje venkova 2007 - 2013 [48].

Ke konci prvního pololetí roku 2009 v České republice ekologicky hospodařilo 2586 zemědělců a počet výrobců biopotravin byl 429. Na celkové spotřebě potravin se v roce 2008 biopotraviny podílely 0,75 % a tuzemští spotřebitelé za ně utratili 1,8 miliardy Kč [49].

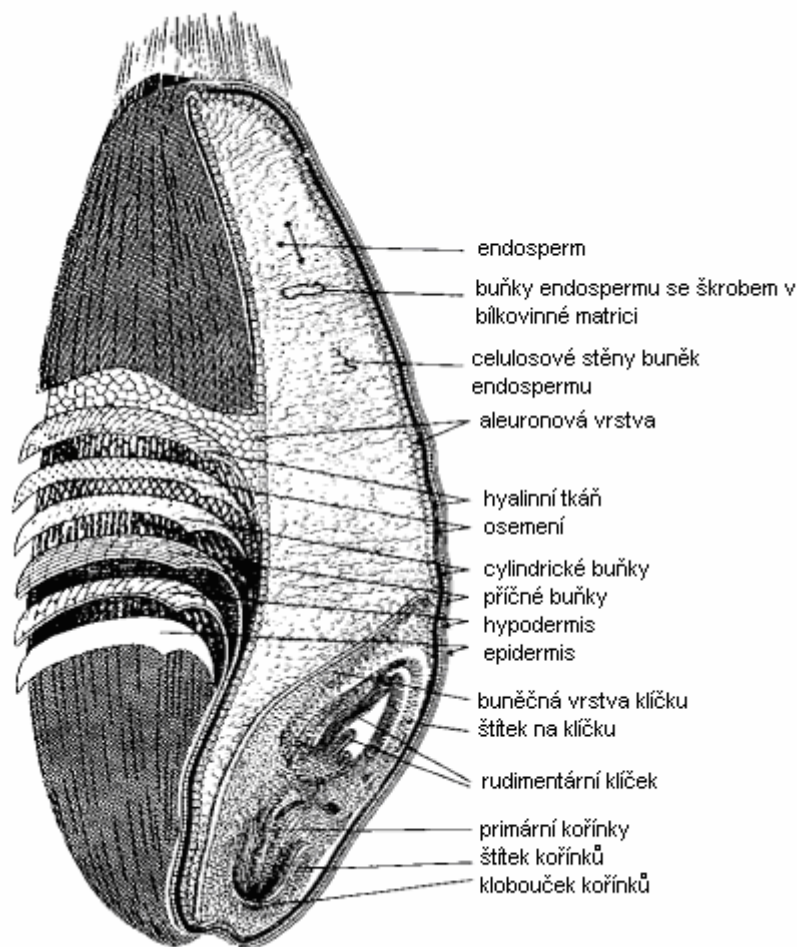
4 OBILOVINY

Obiloviny jsou rostliny využívané pro svá semena - zrna [50]. Jsou základní surovinou pro mlýnský, lihovarnický, pivovarnický, sladařský a krmivářský průmysl [51].

Botanicky patří obiloviny mezi traviny (*Gramineae*), do čeledi lipnicovité (*Poaceae*), řádu lipnicokvěté (*Poales*). Mezi běžně pěstované obiloviny patří pšenice, žito, ječmen, oves, tritikale, kukuřice, proso, čirok a rýže. Pseudoobiloviny jsou rostliny z jiných čeledí než lipnicovité, které se ale přiřazují k této skupině díky stejnému hospodářskému využití a chemickému složení. Jedná se o pohanku z čeledi rdesnovitých (*Polygonaceae*), amarant z čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*) a merlík čilský (quinoa) z čeledi merlíkovitých (*Chenopodiaceae*) [50, 52, 53].

4.1 Morfologická stavba zrna

Každá obilka se skládá z endospermu, klíčku a obalových vrstev. Endosperm představuje 84 - 86 % hmotnosti zrna a obsahuje především škrob a bílkoviny. Od obalových vrstev je oddělen vrstvou aleuronových buněk, které obsahují bílkoviny, minerální látky, tuky a vitaminy. Klíček tvoří nejmenší část obilky a obsahuje mnoho živin, zejména bílkoviny, aminokyseliny, vitaminy rozpustné ve vodě a značné množství vitamínu E. Klíček slouží jako zárodek nové rostliny. Obaly tvoří 8 - 14 % hmotnosti zrna a chrání endosperm a klíček před vysycháním a mechanickým poškozením. Obalové vrstvy se skládají z oplodí a osemení [54].



Obr. 7 Podélný řez pšeničným zrnem [54]

4.2 Chemické složení

Hlavní podíl jednotlivých složek obsažených v obilovinách tvoří sacharidy, zejména glukóza, fruktóza, sacharóza a maltóza. Dále jsou to koloidně disperzní sacharidy jako škrob, dextriny, celulóza, hemicelulózy, pentózany a pektinové látky. Nejdůležitější zásobní látkou v obilce je škrob.

Nejvýznamnější dusíkatou látkou jsou bílkoviny, které často determinují technologickou jakost surovin. Zvláštní postavení má bílkovina pšeničná, která jako jediná vytváří s vodou pružný gel - lepek, jehož fyzikální vlastnosti určují jakost pečiva [55]. Bílkoviny obilovin jsou řazeny mezi neplnohodnotné, limitující aminokyselinou je lyzin [53].

Tuk je obsažen především v klíčku a v aleuronové vrstvě. Tuky chlebových obilovin jsou nažloutlé olejové kapaliny, které obsahují nasycené mastné kyseliny, kyselinu olejovou, linolovou a linolenovou. Tuk v obilce nemá větší technologický význam, klíčky jsou

před mletím odstraňovány. V případě nevhodného skladování však může dojít k hydrolyze tuku a nežádoucímu zvyšování kyselosti mouky.

Zejména v klíčku a aleuronové vrstvě jsou soustředěny vitaminy A, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, C a E. Maximální podíl minerálních látek byl zjištěn v osemeni a v aleuronové vrstvě. Největší podíl minerálií tvoří oxid fosforečný, většinou ve formě fytinu. Dále jsou ve větším množství přítomny oxid draselný, hořečnatý a vápenatý [55].

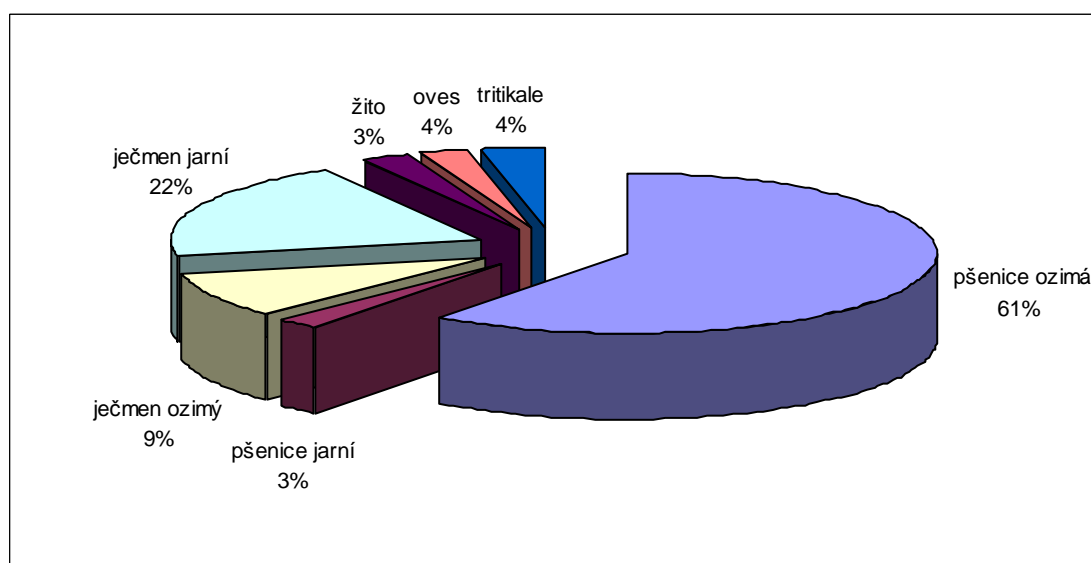
4.3 Produkce

Podle statistik FAO (Food and Agriculture Organization, Organizace pro výživu a zemědělství) se v současné době ve světě řadí k obilovinám s největším objemem produkce pšenice a rýže. Z hlediska celkové produkce je objem produkované pšenice zhruba stejný jako u rýže. Rozdílné je ovšem využití, protože na mouku se rýže zpracovává jen sporadicky, takže podíl jejího užití pro pekařské účely je nepatrný. Tradiční evropské obiloviny jsou pšenice, žito, ječmen a oves, na jihu Evropy pak kukuřice. V Americe byla dříve hlavní obilovinou kukuřice, již dlouho je ale dominantní komoditou pšenice [52, 54].

V České republice jsou obiloviny nejrozšířenější plodinou, v současnosti zaujímají zhruba 1,6 milionů hektarů, z čehož 1,3 milionů hektarů činí každoroční výměra pšenice a ječmene. Od začlenění České republiky do EU je zabezpečována regulace trhu s obilovinami prostřednictvím SOT (Společná organizace trhu). V oblasti odrůd, osiva a sadby s výjimkou trvalých kultur se metodicky řídí a usměrňuje rozvoj šlechtitelské činnosti, odrůdového zkušebnictví a zkoušení osiva a sadby v součinnosti s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským. Nedílnou součástí je i spolupráce se Státní rostlinolékařskou správou [56].

Tab. 3 Sklizeň obilovin v ČR v roce 2009 [57]

	Pšenice	Ječmen	Žito	Oves	Tritikale	Celkem
Celkově ke sklizni [ha]	831 300	454 821	38 454	50 020	52 950	1 427 545
Sklizeno [ha]	831 188	454 821	38 454	49 912	52 950	1 427 325
Podíl sklizených ploch [%]	99,85	100,00	100,00	99,78	100,00	99,93
Celkem sklizeno [t]	4 528 977	2 110 926	178 575	181 094	244 849	7 244 421
Průměrný výnos [t.ha⁻¹]	4,79	4,72	4,64	3,63	4,62	4,48



Obr. 8 Podíl jednotlivých komodit na sklizni obilovin v ČR v roce 2009 [57]

5 CHROMATOGRAFIE

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují jednotlivé složky obsažené ve vzorku [58]. Její podstatou je distribuce složek směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi - mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). Při postupu mobilní fáze podél fáze stacionární dochází k opakovanému transportu složek z jedné fáze do druhé. Doba, po kterou molekuly určité složky setrvávají ve stacionární fázi, závisí na velikosti interakce mezi složkou a stacionární fází a určuje pořadí, v jakém složky vycházejí. Čím větší je interakce, tím později složka vychází [59].

5.1 Rozdělení chromatografických metod

- Dle povahy fází:
 - Plynová chromatografie (GC - Gas Chromatography)
 - Adsorpční - ustavuje se rovnováha mezi mobilní plynnou fází a stacionární pevnou fází (GSC - Gas Solid Chromatography)
 - Rozdělovací - ustavuje se rovnováha mezi mobilní plynnou fází a stacionární kapalnou fází (GLC - Gas Liquid Chromatography)
 - Kapalinová chromatografie (LC - Liquid Chromatography)
 - Adsorpční - ustavuje se rovnováha mezi mobilní kapalnou fází a stacionární pevnou fází (LSC - Liquid Solid Chromatography)
 - Rozdělovací - ustavuje se rovnováha mezi mobilní kapalnou fází a stacionární kapalnou fází (LLC - Liquid Liquid Chromatography)
- Dle uspořádání fází:
 - Kolonová (sloupcová) chromatografie
 - stacionární fáze v koloně
 - Plošná chromatografie
 - Chromatografie na tenké vrstvě (TLC - Thin Layer Chromatography)
 - Papírová chromatografie (PC - Paper Chromatography)
- Dle děje, který probíhá:
 - Adsorpční chromatografie - využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrchu tuhé fáze s aktivními centry (LSC - Liquid Solid Chromatography)

- Rozdělovací chromatografie - využívá rozdílné rozpustnosti molekul analytů mezi dvěma zcela nemísitelnými kapalinami (LLC - Liquid Liquid Chromatography)
- Iontově výměnná chromatografie - využívá rozdílné výměnné adsorpce analytů na povrchu iontového měniče (IEC - Ion Exchange Chromatography)
- Gelová permeační chromatografie - využívá mechanického dělení molekul analytů v pórech gelu na základě jejich rozdílné velikosti (GPC - Gel Permeation Chromatography) [60, 61]

5.2 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie [62].

Vysoké účinnosti separačního procesu je dosahováno použitím kolon naplněných stacionární fází o malé definované velikosti částic. Separační kolony se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně a tedy i velkým hydrodynamickým odporem [62].

Dostatečný průtok mobilní fáze je zajištěn aplikací vysokého tlaku (jednotky až desítky MPa), proto bývá tato metoda také nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography). Dávkují se řádově mikrolity vzorku. K detekci je nutné použití citlivých detektorů, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Výhodou je možnost ovlivňovat separaci složením mobilní fáze, nevýhodou pak náročnější instrumentace a složitější mechanismus separace [63].

Vysoce účinná kapalinová chromatografie umožňuje analýzu iontů, látek polárních i nepolárních, málo těkavých, tepelně nestabilních i vysokomolekulárních. Udává se, že 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat metodou HPLC [63].

HPLC se od klasické kapalinové chromatografie odlišuje tím, že pracuje s kratšími kolonami (3 - 30 cm) s menším vnitřním průměrem (0,5 - 4 mm) a s vysokou účinností (> 40000 teoretických pater. m^{-1}). S takovými kolonami je třeba pracovat při vyšších tlacích (až do 60 MPa), aby bylo možno dosáhnout přijatelného průtoku a doby analýzy. Eluát z kolony prochází detektorem s průtočnou celou malého vnitřního objemu (obvykle 0,5 - 15 μl), jehož signál se zpracovává pomocí počítačového softwaru [64].

Tab. 4 Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s ostatními separačními metodami [63]

Metoda	Přibližný rozsah molekulových hmotností analytů M_r	Analyzované látky
HPLC	3 - 10^6	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
GC	1 - 400	plyny, látky těkavé a tepelně stabilní, po deprivatizaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
PC, TLC	100 - 2000	ionty, látky polární i nepolární
CE (CZE, CEC, MEKC)	3 - 10^6	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery

CE - Kapilární elektroforéza, CZE - Kapilární zónová elektroforéza, CEC - Kapilární elektrochromatografie, MEKC - Micelární elektrokinetická chromatografie

5.3 Základní pojmy

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

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

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

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

Redukovaný retenční čas je čas, který příslušný analyt stráví ve stacionární fázi [61].

Při dělení směsí látek, jejichž eluční parametry se příliš neliší, se používá **izokratická eluce** jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména jestliže

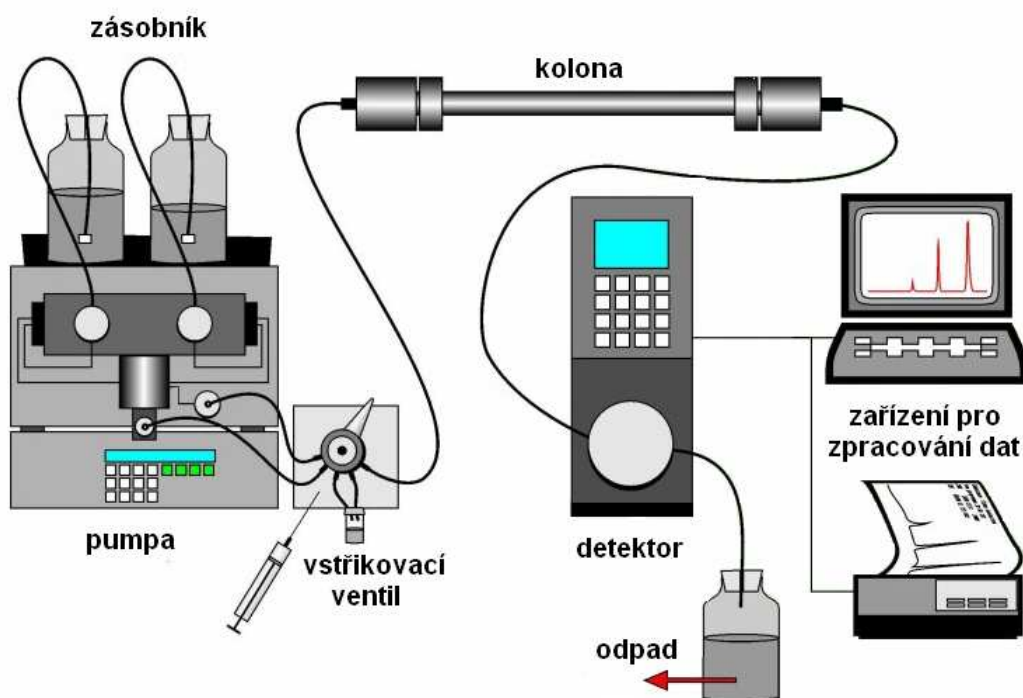
se jednotlivé složky směsí svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se využívá **gradientové eluce**, při které se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává množství druhé mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient. Obdobným způsobem lze pro eluci využít i gradient pH [62].

Chromatografie v systémech s normálními fázemi (NP - Normal Phase) využívá polární stacionární fáze, jimiž mohou být anorganické polární adsorbenty (silikagel, oxid hlinitý, oxid zirkoničitý) či adsorbenty, jejichž polarita je snížena chemickou modifikací adsorpčních center a kde lze využít selektivních interakcí funkčních skupin chemicky vázaných na povrchu adsorbentu (tzv. aminové, nitridové, diolové a další středně polární fáze).

Chromatografie v systémech s převrácenými fázemi (RP - Reversed Phase) využívá nepolárních nebo mírně polárních stacionárních fází jako je silikagel s chemicky vázanými oktadecylovými, oktalyovými či jinými alkylovými, alkylarylovými, ale i nitrilovými skupinami. Mobilní fáze jsou vždy polárnější než fáze stacionární a skládají se většinou z vody a jednoho či více polárních rozpouštědel, nejčastěji metanolu, acetonitrilu nebo tetrahydrofuranu [64].

5.4 Instrumentace pro HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, které zabezpečuje transport mobilní fáze kolonou, dávkovače vzorků, chromatografické kolony, kde se složky vzorku separují a detektoru poskytujícího elektrický signál při průchodu separovaných látek jako odezvu úměrnou změně sledované vlastnosti eluátu vytékajícího z kolony. Separační kolona je zpravidla umístěna v termostátové skříni pro dobrou reprodukovatelnost výsledků. Přístroj doplňuje zařízení pro záznam a ukládání signálu detektoru, vyhodnocování chromatogramů a zpracování chromatografických dat. Časová závislost elektrického signálu se po úpravě zaznamená jako chromatogram pomocí počítače, kde se signál automaticky vyhodnocuje a zpracovává [64].



Obr. 9 Uspořádání HPLC [65]

5.4.1 Zásobníky mobilní fáze

Jako zásobník mobilní fáze lze použít libovolnou uzavřenou nádobu chemicky odolnou vůči používaným rozpouštědlům. Ze zásobníku se mobilní fáze čerpá přes filtr, aby se zabránilo pronikání nečistot do čerpadla. Důležité je i odplynění mobilní fáze, které je nezbytné pro prevenci tvorby bublinek při poklesu tlaku na výstupu z kolony, což by rušilo detekci i funkci čerpadla [66]. K odplynění lze využít ultrazvuk, ohřev či probublávání heliem. Rychlejší, účinnější a levnější je však použití vakuového degasseru. Mobilní fáze prochází přes kapiláru polopropustnou pro plyny a nepropustnou pro kapaliny. Ta je umístěna ve vakuové komoře a rozdíl tlaku vně a uvnitř kapiláry zajišťuje kontinuální odplynění mobilní fáze [67, 68].



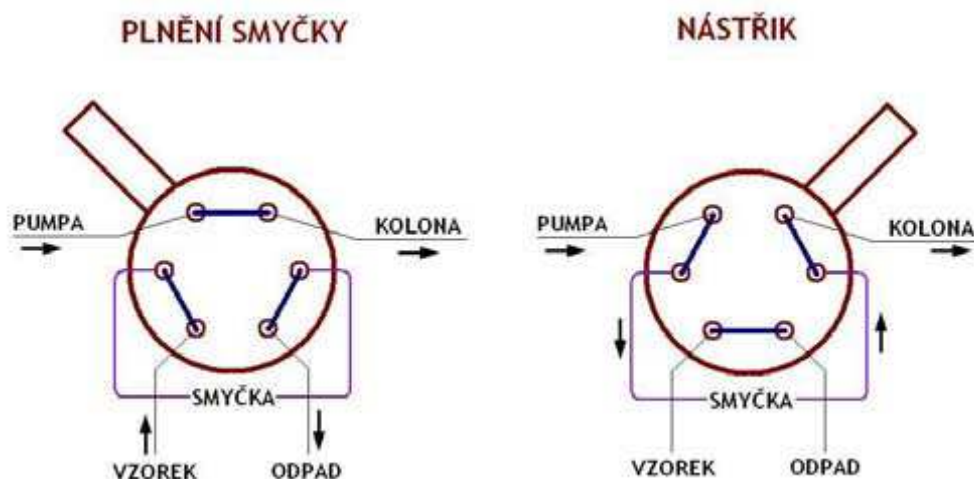
Obr. 10 Zásobník mobilní fáze [69]

5.4.2 Čerpadla mobilní fáze

V současné době se většinou používají čerpadla s malým objemem využívající rychlé frekvence pracovních cyklů, v nichž se mobilní fáze přes systém zpětných ventilů střídavě nasává ze zásobníku do malé pístní komory o objemu 10 - 400 μl a vytlačuje se z ní na chromatografickou kolonu. Čerpadla musí být konstruována z materiálů odolných vůči chemické korozi i při použití poměrně agresivních mobilních fází (např. slabě kyselých tlumivých roztoků). Mají být schopna dávkovat plynule kapaliny bez kolísání průtoku při pracovních tlacích 30 - 60 MPa s průtoky přesně nastavitelnými v mezích od 0,1 až do 10 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro práci s konvenčními analytickými kolonami či od 0,01 nebo 0,001 do 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro práci s mikrokolonami [64].

5.4.3 Dávkovací zařízení

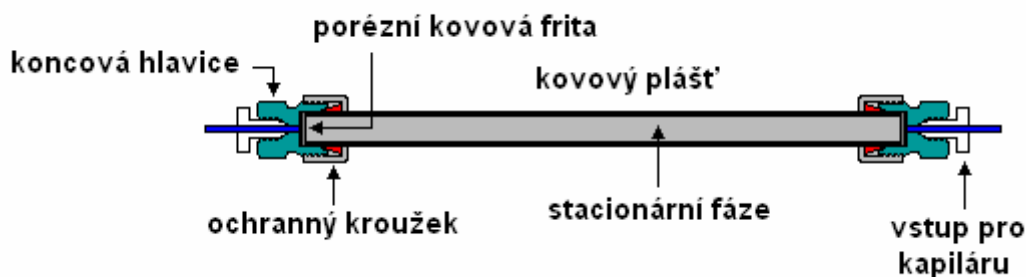
Přesně definovaný objem vzorku musí být nastříknut do proudu mobilní fáze protlačované kolonou pod velkým tlakem. K dávkování se běžně používá ventil s dávkovací smyčkou definovaného objemu [70]. U manuálně ovládaných ventilů se dávkovací smyčka nejprve naplní vzorkem pomocí injekční stříkačky a vzorek se dávkuje přepnutím smyčky do druhé polohy. Automatický dávkovač je vybaven zásobníky s vialkami obsahujícími řadu vzorků. Po naprogramování sekvence vzorků a doby každé analýzy mohou chromatografy zpracovávat velké série vzorků [64].



Obr. 11 Dávkování vzorku [71]

5.4.4 Kolony

V koloně probíhá vlastní separace složek analyzovaného vzorku. Separační kolony používané v HPLC musí umožnit separaci s vysokou účinností a požadovanou selektivitou, která se nemá významně snižovat s časem, mají mít dobrou mechanickou a chemickou odolnost vůči vysokým pracovním tlakům a složkám použité mobilní fáze. Rovněž by měly mít dostatečně dlouhou životnost a kolony stejného typu od stejného výrobce by měly vykazovat reprodukovatelné vlastnosti. Komerční kolony pro HPLC nejčastěji tvoří rovné bezešvé trubice vyrobené z nerezové oceli, případně z tvrzeného skla, titanu nebo pevného polymeru, opatřené na koncích fritami (zpravidla s póry o velikosti 0,5 - 2 μm), které v koloně zadržují částice náplně. Kolony se dodávají buď s upevněným koncovým šroubením nebo jako výměnné plněné trubice s fritami pro upevnění v držácích s koncovkami pro opakované použití. Rozměry kolon se řídí účelem použití. K analytickým separacím většinou slouží konvenční kolony o délce 10 - 25 cm a vnitřním průměru 3 - 4,6 mm plněné částicemi o velikosti 5 μm , méně často i 3, 7 nebo 10 μm . Kratší kolony 3 - 6 cm stejného vnitřního průměru umožňují dosáhnout jednodušších separací během 1 - 3 minut při významné úspoře rozpouštědel a zlepšit produktivitu laboratoří [64]. Stabilní teplota kolony přispívá ke zvýšení reprodukovatelnosti retenčních časů. Pro udržení požadované teploty je určen termostat [72, 73]. Běžně se používá teplotní rozmezí 30 až 50 $^{\circ}\text{C}$ [73].



Obr. 12 Sestava kolony [74]

5.4.5 Náplně kolon

Náplně používané v HPLC se připravují jak z pórovitých anorganických materiálů, tak i z organických polymerů. Nejčastěji se využívají materiály na bázi silikagelu, buď bez úprav nebo jako nosiče chemicky modifikované navázáním nepolárních středně či silně polárních stacionárních fází. Méně běžné jsou jiné typy anorganických nosičů - oxid hlinitý, zirkoničitý, titaničitý nebo grafický uhlík, jejichž chemická odolnost usnadňuje separace basických sloučenin, které obvykle vyžadují mobilní fáze s vysokým pH (12 - 14). Materiály na bázi silikagelu jsou zpravidla málo stabilní v mobilních fázích o pH vyšším než 8,5. Silikagelový nosič je tepelně odolný asi do 70 °C. Pórovitost materiálů pro HPLC kolony závisí na velikosti molekul separovaných látek. Pro separaci běžných organických látek jsou vhodné částice s velikostí pórů 7 - 12 nm, zatímco separace polymerů vyžadují částice se širokými póry 15 - 100 nm. Kolony plněné kulovitými částicemi vykazují zlepšení účinnosti a snížení tlakového spádu ve srovnání s kolonami plněnými částicemi nepravidelného tvaru [64].

5.4.6 Prodloužení životnosti HPLC kolon

Životnost kolon je ovlivněna mechanickými nečistotami, které jsou přítomny v mobilní fázi nebo ve vzorku. Frity v HPLC kolonách mají porozitu 0,5 - 2 μm , takže mohou být většími částicemi postupně ucpávány, čímž se zvyšuje zpětný tlak na koloně. Menší částice jsou unášeny dále na kolonu a postupně ucpávají lože se sorbentem, což má za následek opět růst zpětného tlaku. Vzorky lze filtrovat membránovými filtry, které se nasazují na injekční stříkačku. Pro filtraci mobilní fáze se využívají filtry s porozitou 0,45 μm nebo 0,20 μm vyrobené z různých materiálů dle složení mobilní fáze. Mobilní fázi je třeba

i odplynit, protože rozpuštěné bublinky plynu zvyšují šum na detektoru. Pro mechanickou ochranu kolony se dají použít i různé mechanické filtry, které se šroubují přímo na začátek analytické kolony. Častou a účinnou ochranou analytické kolony je používání předkolon. Ty mohou být plněny sorbentem s větší zrnitostí (38 - 44 μm). Při použití těchto předkolon dochází sice k účinné ochraně analytické kolony, ale zároveň i k mírné ztrátě teoretických pater (5 %). Pokud se použijí předkolony se stejným sorbentem jako má analytická kolona, dojde k odpovídajícímu nárůstu teoretických pater. Je třeba počítat i s prodloužením doby analýzy [64].



Obr. 13 Předkolona [71]

5.4.7 Detektory

Detektory slouží k indikaci látek vycházejících z chromatografické kolony. K detekci separovaných látek se zpravidla využívá jejich určitých vlastností, jimiž se tyto látky liší od složek mobilní fáze [75]. Rozeznáváme detektory selektivní, jejichž signál je úměrný pouze koncentraci analyzované látky v eluátu a detektory univerzální, které poskytují signál úměrný určité vlastnosti eluátu jako celku (separované látky i mobilní fáze) [64].

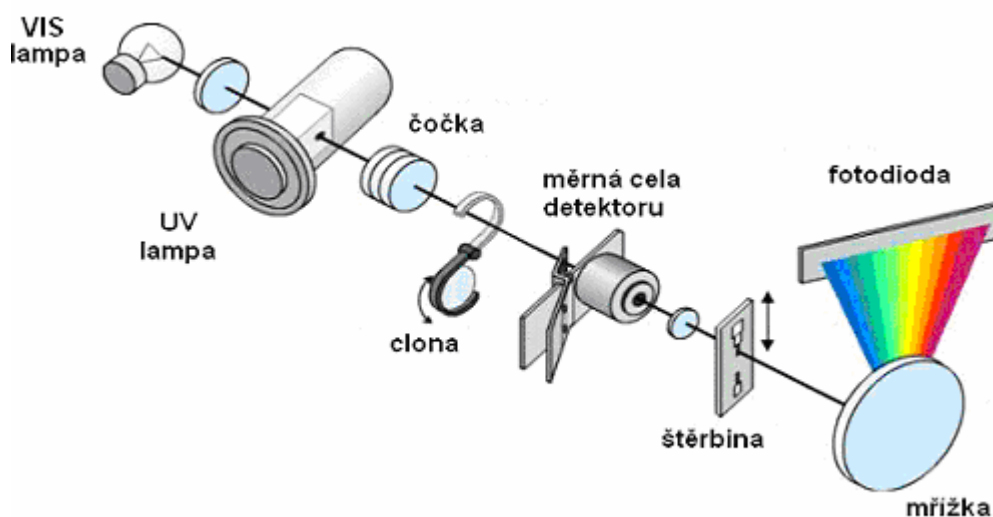
Na detektory v HPLC jsou kladeny zejména tyto požadavky: vysoká citlivost, linearita a reprodukovatelnost odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost [62].

- **Fotometrické detektory (UV/VIS)**

Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony [58]. Přes stěnu kyvety prochází světelný paprsek přicházející ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu. Typ světelného zdroje závisí na sledovaném oboru vlnových délek. Pro ultrafialovou oblast (200 nm - 350 nm) se používá deuteriová výbojka, pro oblast viditelného záření (350 nm - 700 nm) halogenová žárovka [70].

- **Detektory s diodovým polem (DAD, Diode Array Detector)**

Jedná se o spektrofotometrické detektory s velkým počtem plošných fotodiod umístěných na křemíkové destičce o délce 1 - 2 cm, na něž dopadá záření po průchodu celou a spektrálním rozkladu holografickou mřížkou, které umožňují současnou detekci a integraci chromatogramů při větším počtu předem zvolených vlnových délek [64].



Obr. 14 Detektor s diodovým polem [76]

- **Fluorimetrické detektory (FLD)**

Tyto vysoce selektivní a citlivé detektory pracují na principu fluorescence, což je schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak vysílat záření o vyšší vlnové délce, které se měří fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření [58]. Jako excitační zdroje se používají nízkotlaké rtuťové výbojky, xenonové lampy nebo laser [66].

- **Refraktometrické detektory (RI)**

Tento typ detektorů měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Obsahuje-li eluát složku, objeví se výchylka [58].

- **Elektrochemické detektory (ECD)**

Používají se k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). Látky, na které se elektrochemická detekce aplikuje, reprezentují velké množství důležitých léčiv, polutantů a přírodních produktů [77].

Amperometrické detektory se vyznačují vysokou selektivitou a citlivostí a nejsou vhodné pro použití při gradientové eluci. Ještě citlivější jsou coulometrické detektory pracující

s průtočnými elektrodami z pórovitého grafitického uhlíku, na nichž dochází k úplnému průběhu elektrochemické reakce analyzovaných látek [64].

- **Hmotnostní detektory (MS)**

Umožňují přímou identifikaci jednotlivých separovaných látek vycházejících z kolony na základě získaných hmotnostních spekter [70].

Tab. 5 Charakteristika HPLC detektorů [62]

Detektor	Selektivita	Citlivost [g.ml ⁻¹]
IČ	selektivní	10 ⁻⁶
RI	univerzální	5.10 ⁻⁷
UV/VIS, DAD	selektivní	5.10 ⁻¹⁰
FLD	selektivní	10 ⁻¹⁰
ECD	selektivní	10 ⁻¹⁰
MS	selektivní	10 ⁻¹⁰

5.4.8 Mobilní fáze

Mobilní fáze v kapalinové chromatografii není inertní, ale významně se podílí na separačním procesu. Možnosti změny složení mobilní fáze jsou v podstatě neomezené. Změna složení mobilní fáze je vždy jednodušší než použití jiné stacionární fáze. Vzhledem k interakcím mezi soluty a složkami mobilní fáze lze separaci ovlivnit nejen změnou zastoupení různých rozpouštědel v mobilní fázi, ale i změnou pH, iontové síly či přidávkem činidel, která se soluty tvoří iontové páry, komplexy apod. Charakter mobilní fáze je důležitý nejen z hlediska separace v koloně, ale rovněž z hlediska detekce [63, 66]. Optimální mobilní fáze musí v detektoru poskytovat minimální signál, musí umožňovat co nejcitlivější a nejreprodukovatelnější detekci solutů a změny ve složení mobilní fáze při gradientové eluci by neměly signál detektoru ovlivňovat. Ideální mobilní fáze by měla být dobrým rozpouštědlem separovaných látek, být kompatibilní s použitým detekčním systémem, mít vhodnou eluční sílu, být dostatečně selektivní pro všechny složky směsi, být nehořlavá a netoxická a dostupná v co nejčistší formě [66].

5.4.9 Základní aplikace HPLC

Využití HPLC v praxi je nesmírně rozsáhlé. Svoje uplatnění našla v klinické chemii, toxikologii a medicíně, kde postupně nahrazuje plynovou chromatografii při analýzách důležitých látek s výjimkou látek velmi těkavých a plyných. Významné je použití HPLC při stanovení bází, nukleosidů a nukleotidů, aminokyselin a jejich derivátů, peptidů a proteinů. Dále umožňuje sledovat metabolismus léčiv, uplatňuje se při analýzách stopových koncentrací složek životního prostředí, zejména škodlivin ve vodě, půdě a ovzduší jako jsou pesticidy, insekticidy či herbicidy. HPLC zaujímá též významné místo v potravinářském průmyslu při sledování stárnutí, znečištění a rozkladu potravin. V klinické praxi se pomocí HPLC provádějí analýzy nejrůznějších komponent v tkáních a tělních tekutinách - hormonů, steroidů, léčiv a jejich metabolitů. Metodou vysoce účinné kapalinové chromatografie lze přímo analyzovat cukry, přírodní fenolické látky, volné mastné kyseliny, lipidy a fosfolipidy. Je také vhodnou metodou k rozboru ve vodě rozpustných látek, především vitaminů, antibiotik a alkaloidů [66, 75, 78, 79, 80, 81].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 METODIKA

6.1 Chemikálie

- Standard D,L- α -tokoferol (Fluka, SRN)
- Standard D,L- α -tokoferolacetát (Fluka, SRN)
- Metanol pro HPLC (Sigma - Aldrich, SRN)
- Etanol denaturovaný (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Metanol (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Aceton (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Hexan (dodavatel Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
- Redestilovaná voda

6.2 Pomůcky a přístroje

- Standardní laboratorní vybavení
 - Předvážky (Kern, SRN)
 - Analytické váhy (Adam, AFA - 210 - LC, Schoeller instruments, ČR)
 - Temperovaná vodní lázeň s třepačkou (Mettler, SRN)
 - Lednice (Whirpool, ČR)
 - Multikráječ (ETA 0078, ČR)
 - Soxhletova extrakční aparatura
 - Vakuová rotační odparka (Ika - Werke RV 05 – ST, SRN)
 - Filtrační aparatura (Nylonový filtr, 47 mm x 0,2 μ m, Supelco, USA)
 - Filtrační papír (FILTRAK No.390 \varnothing 15 cm)
 - Hliníková fólie
 - Injekční stříkačka (Chirana, SR)
 - Sušárna (Venticell 111 Comfort, BMT, ČR)
 - Běžné laboratorní sklo a pomůcky
- Speciální laboratorní vybavení
 - Aparatura pro HPLC (Hewlett Packard 1100)
 - Degasser G1322A
 - Binární pumpy G1312A
 - Termostat kolon G1316A

- Detektor UV/VIS DAD G1315A
- Kolony - Supelcosil LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
 - Ascentis C 18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
 - Supelcosil LC 18 DB (250 x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
 - Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m, Supelco, USA)
- Dávkovací ventil analytický smyčkový - dávkovací smyčka o objemu 20 μ l
- PC s vyhodnocovacím programem ChemStation - Instrument 1 (Agilent, USA)
- Dávkovací stříkačka o objemu 50 μ l (Hamilton, USA)
- Mikrofiltry (Cronus Syringe Filter Nylon 13 mm x 0,45 μ m, UK)



Obr. 15 HPLC sestava HP 1100

6.3 Vzorky obilovin

Pro analýzu byly vybrány obiloviny v bio kvalitě. Jednotlivé vzorky byly dodány přímo výrobcem PRO-BIO, s.r.o., Staré Město pod Sněžníkem. Skladovány byly v původním obalu v temnu při laboratorní teplotě a to nejdéle 4 měsíce od data balení.

6.3.1 Kamut

Kamut je prastarý příbuzný dnešní pšenice, který pochází z Egypta.

Průměrné nutriční hodnoty ve 100 g udávané výrobcem: energie 1 507 KJ (358 kcal), 18,6 g bílkovin, 68,2 g sacharidů, 2,8 g tuků, 411 mg fosforu, 153 mg hořčíku, 4,3 mg zinku, 4,3 mg železa, 5,54 mg niacinu, 0,45 mg tiaminu

Země původu: Kanada

Minimální trvanlivost do: 2.7.2010

Výrobce doporučuje skladování při teplotě do 25 °C a relativní vlhkosti nejvýše 75 %.

Hmotnost balení: 500 g

Obal: polypropylenová fólie s potiskem



Obr. 16 Kamut

6.3.2 Špaldové kernotto (velké kroupy)

Špaldové kernotto vzniká loupáním a broušením špaldy.

Průměrné nutriční hodnoty ve 100 g udávané výrobcem: energie 1 480 KJ (353 kcal), 18 g bílkovin, 66 g sacharidů, 2,5 g tuků, 250 mg hořčíku, 4,3 mg niacinu, 0,8 mg tiaminu

Země původu: ČR

Minimální trvanlivost do: 2.6.2010

Výrobce doporučuje skladování při teplotě do 25 °C a relativní vlhkosti nejvýše 75 %.

Hmotnost balení: 500 g

Obal: polypropylenová fólie s potiskem



Obr. 17 Špaldové kernotto

6.3.3 Grünkern

Grünkern vzniká speciálním sušením a uzením zelených zrn pšenice špaldy sbírané v mléčné zralosti.

Průměrné nutriční hodnoty ve 100 g udávané výrobcem: energie 1 382 KJ (329 kcal), 12,3 g bílkovin, 62,5 g sacharidů, 3 g tuků

Země původu: Rakousko

Minimální trvanlivost do: 25.8.2010

Výrobce doporučuje skladování při teplotě do 25 °C a relativní vlhkosti nejvýše 75 %.

Hmotnost balení: 300 g

Obal: polypropylenová fólie s potiskem



Obr. 18 Grünkern

6.3.4 Špalda loupaná

Jedná se o starou odrůdu pšenice. Je to velice kvalitní obilovina, která je určena pro přímou spotřebu.

Průměrné nutriční hodnoty ve 100 g udávané výrobcem: energie 1 480 KJ (352 kcal), 16 g bílkovin, 68 g sacharidů, 2,5 g tuků, 250 mg hořčíku, 4,3 mg niacinu, 0,6 mg tiaminu

Země původu: ČR

Minimální trvanlivost do: 5.4.2010

Výrobce doporučuje skladování při teplotě do 25 °C a relativní vlhkosti nejvýše 75 %.

Hmotnost balení: 1 kg

Obal: polypropylenová fólie s potiskem



Obr. 19 Špalda loupaná

6.4 Optimalizace při testování izolačního postupu

6.4.1 Soxhletova extrakční metoda

Pro extrakci byly vybrány obiloviny kamut a špaldové kernotto. Zrna byla rozdracena multikráječem a ze získané sytké směsi bylo do papírové extrakční patrony naváženo vždy 10 g vzorku s přesností na 0,01 g. Objem použitého rozpouštědla byl zvolen 80 ml. Pro kamut byla použita extrakční činidla etanol, hexan a směs metanol : hexan (1 : 1), pro špaldové kernotto aceton, metanol, etanol a směs aceton : metanol (1 : 1). Ke vzorkům kernotta s metanolem a kernotta s etanolem byla přidáno malé množství kyseliny askorbové v práškové podobě. Ta působí jako antioxidant a tudíž by mohla přispět k ochraně vitamínu E před oxidací. Extrakce trvala 2 hodiny. Poté došlo k odpaření rozpouštědla na vakuové rotační odparce při teplotě vodní lázně do 50 °C, s výjimkou odpařování etanolu, kde musela být aplikována vyšší teplota. Získaný odparek byl rozpuštěn v 10 ml metanolu a zfiltrován nejprve přes filtrační papír a potom i přes nylonový filtr. Při práci byl vzorek chráněn hliníkovou fólií kvůli zabránění přístupu světla.

6.4.2 Extrakce pod zpětným chladičem

Do zábrusové baňky obalené hliníkovou fólií bylo naváženo 10 g rozdracených zrn kamutu s přesností na 0,01 g. Použita byla rozpouštědla metanol a etanol. Doba extrakce byla zvolena nejprve 1 hodinu, poté byla zkoušena i extrakce trvající 2 hodiny. Vzorek byl následně zfiltrován přes filtrační papír i nylonový filtr.

6.4.3 Extrakce ve vodní lázni

Zrna špaldového kernotta byla rozdracena a 10 g vzorku váženého s přesností na 0,1 g bylo převedeno do varné baňky. Ta byla po přidavku rozpouštědla obalena hliníkovou fólií a vložena do vodní lázně. Byla zkoušena rozpouštědla metanol a etanol, jejich objem činil 50 ml. Teplota vodní lázně byla zvolena 30 °C, posléze i 40 °C. Testován byl také čas extrakce, vyzkoušeny byly 2 hodiny, dále 2,5; 3; 4 a 5 hodin. Pro filtraci byl použit filtrační papír.

6.5 Modelace chromatografických podmínek pro analýzu vitamínu E

Ke zjištění optimálních chromatografických podmínek pro stanovení vitamínu E byly použity standardy D,L- α -tokoferol a D,L- α -tokoferolacetát. Jejich skladování probíhalo v neprůhledných skleněných obalech v chladničce. Z důvodu ochrany standardů před světlem byla po celou dobu přípravy vzorků používána hliníková fólie, kterou bylo obalováno laboratorní sklo. Před vlastním nástřikem bylo třeba vzorky přefiltrovat přes nylonový mikrofiltr. Eluce vzorků probíhala izokraticky po celou dobu analýzy. K vyhodnocení výsledků byl využit chromatografický program ChemStation Instrument 1.

6.5.1 Testování rozpustnosti standardu

Nejprve byla zkoušena rozpustnost standardu. Vybrat vhodné rozpouštědlo bylo důležité z důvodu následného dávkování vzorku na kolonu. Testován byl metanol a etanol. Malé množství standardu bylo převedeno do kádinky a k němu bylo přidáno zhruba 5 ml rozpouštědla. Po promíchání byla hodnocena rozpustnost, zda-li je roztok čirý a kvantitativně rozpuštěn.

6.5.2 Vlastní měření na koloně Supelcosil LC 8

Navážka 0,0010 g standardu byla kvantitativně převedena do 10 ml odměrné baňky a doplněna metanolem, čímž byl získán zásobní roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z něj byly postupně připraveny roztoky o koncentraci 50 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Při prvním měření byla použita kolona Supelcosil LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Objem dávkovací smyčky byl 20 μl . Jako mobilní fáze byl zvolen metanol s průtokem 0,8 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota termostatu kolony byla nastavena na 30 $^{\circ}\text{C}$. Doba analýzy D,L- α -tokoferolu byla 20 minut, u D,L- α -tokoferolacetátu trvalo měření 25 minut. Detekce proběhla v UV oblasti při vlnových délkách 210, 230, 254, 280 a 310 nm. Byly proměřeny vzorky o koncentraci 100, 50 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Poté byl zvýšen průtok mobilní fáze na 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a dávkovány byly roztoky o koncentraci 20 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Proběhla změna složení mobilní fáze na metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5. Proměřeny byly všechny připravené koncentrace.

6.5.3 Vlastní měření na koloně Ascentis C 18

Ze zásobního roztoku D,L- α -tokoferolu o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl rozpuštěním v metanolu připraven vzorek standardu, jehož koncentrace činila $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Stejný postup byl aplikován i na přípravu vzorku D,L- α -tokoferolacetátu o stejné koncentraci.

Do HPLC aparatury byla umístěna kolona Ascentis C 18 (150 x 4,6 mm; 5 μm). Objem dávkovací smyčky byl 20 μl . Jako mobilní fáze byl použit metanol. Průtok mobilní fáze byl nastaven na $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Teplota termostatu kolony při měření byla $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Analýza probíhala po dobu 25 minut. Zvoleny byly vlnové délky 210, 230, 254, 280, 310 nm. Změřeny byly postupně vzorky obou koncentrací 20 i $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Poté došlo k obměně mobilní fáze na metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5. Vlnová délka 310 nm byla nahrazena 270 nm. Znovu byly proměřeny tytéž vzorky.

6.5.4 Vlastní měření na koloně Supelcosil LC 18 DB

Prvním krokem byla příprava zásobního roztoku D,L- α -tokoferolu o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z něj byly ředěním metanolem přichystány vzorky o koncentraci 50 a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Dále byl připraven roztok standardu D,L- α -tokoferolacetátu rozpuštěním v metanolu tak, aby výsledná koncentrace byla $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z tohoto roztoku byl následně připraven vzorek o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Separace proběhla na koloně Supelcosil LC 18 DB (250 x 4,6 mm; 5 μm). Dávkován byl alikvotní podíl 20 μl . Testována byla mobilní fáze metanol, průtok byl zpočátku $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, poté i $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Udržována byla teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Čas analýzy byl nastaven na 35 minut. Signál byl snímán při vlnových délkách 210, 220, 254 a 270 nm. Pro měření D,L- α -tokoferolu byly vybrány koncentrace 20 a $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. K analýze D,L- α -tokoferolacetátu byl použit vzorek o koncentraci $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V průběhu byly zkoušeny i mobilní fáze metanol : redestilovaná voda v poměrech 80 : 20 a 95 : 5. Proběhla i změna vlnových délek 254 a 270 nm na 230, 280 a 310 nm.

6.5.5 Vlastní měření na koloně Discovery C 18

Standardy byly rozpuštěny v metanolu takovým způsobem, aby byly získány zásobní roztoky o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z nich byly připraveny vzorky, které měly koncentraci 50 a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Testována byla kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Byl použit dávkovací ventil se smyčkou o objemu 20 µl. Mobilní fáze byla složena z metanolu a redestilované vody v poměru 95 : 5. Průtok byl nastaven na 0,8 ml.min⁻¹. Teplota kolony při měření byla 30 °C. Čas pro analýzu byl zadán 30 minut. Vzorky byly měřeny při vlnových délkách 210, 220, 230, 254, 280 a 310 nm. Po proměření roztoků o koncentraci 50 µg.ml⁻¹ byl průtok mobilní fáze zvýšen na 1 ml.min⁻¹ a změřena koncentrace 20 µg.ml⁻¹.

6.6 Kalibrační křivka

K vytvoření kalibrační křivky potřebné pro následné kvantitativní stanovení obsahu vitamínu E byl použit D,L- α -tokoferol. Bylo naváženo 0,0060 g standardu s přesností na 0,0001 g. Poté došlo k rozpuštění navážky v metanolu takovým způsobem, že byl získán zásobní roztok o koncentraci 600 µg.ml⁻¹. Z něj byla pro následné měření připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 6, 10, 20, 40, 60, 100, 200 a 300 µg.ml⁻¹. Před dávkováním proběhlo přefiltrování vzorků přes nylonový mikrofiltr. K analýze byla použita kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Objem dávkovací smyčky byl 20 µl. Složkami mobilní fáze byly metanol a redestilovaná voda, poměr nastaven na 95 : 5. Průtok mobilní fáze činil 1 ml.min⁻¹. Během experimentu byla udržována stabilní teplota termostatu kolony 30 °C. Analýza trvala 35 minut, každý vzorek byl proměřen třikrát. Detekce proběhla při vlnových délkách 210, 220 a 230 nm. Tlak při analýze se pohyboval okolo 101 barů, což odpovídá 10,1 MPa.

6.7 Stanovení vitamínu E ve vybraných vzorcích obilovin

Pro analýzu byly zvoleny tyto obiloviny vypěstované v ekologickém zemědělství: kamut, špaldové kernotto, grünkern a špalda loupaná. Stanovení vitamínu E zahrnovalo následující kroky: přípravu vzorku, extrakci vitamínu ze vzorku, přečištění extraktu a vlastní analýzu.

Obilná zrna byla rozdrcena a převedena do tmavé plastové lahvičky. Do tří varných baněk bylo naváženo 10 g vzorku s přesností na 0,0001 g. Následoval přídavek 50 ml metanolu. Baňky byly obaleny hliníkovou fólií a ponořeny na 3 hodiny do vodní lázně o teplotě 40 °C. Po celou dobu byly vzorky v lázni třepány. Poté byl extrakt přefiltrován, použit byl filtrační papír FILTRAK No.390 Ø 15 cm. Pro separaci jednotlivých složek byla použita předkolona security guard Phenomenex C 18 4 x 3 mm a kolona Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 µm). Před nástřikem 20 µl vzorku byl použit mikrofiltr Cronus Syringe

Filter Nylon 13 mm x 0,45 μm . Mobilní fáze byla tvořena směsí metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5. Byl nastaven průtok mobilní fáze o rychlosti 1 ml.min⁻¹. Stanovení probíhalo při teplotě 30 °C po dobu 35 minut. Zvoleny byly vlnové délky 210, 220 a 230 nm. Vzorek byl vždy proměřen pětkrát. Tlak kolísal v rozmezí 105 až 110 barů, čili 10,5 až 11,0 MPa.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Výsledky testování izolačního postupu

Extrakce vitamínu E byla zkoušena Soxhletovou metodou, použitím zpětného chladiče a vodní lázně.

7.1.1 Výsledky Soxhletovy extrakční metody

Soxhletova extrakční metoda byla popsána v kapitole 6.4.1. V případě použití rozpouštědel hexanu, acetonu a směsi metanol : hexan v poměru 1 : 1 byly získány zakalené roztoky, které by nemohly být proměřeny. U etanolu nastal problém s nutností použití vyšší teploty při jeho odpařování. Teplota by totiž neměla přesáhnout 40 až 50 °C, jinak může dojít k rozkladu lipofilních vitaminů [82]. Dle experimentu lze usoudit, že vhodnými rozpouštědly pro extrakci jsou metanol a směs aceton : metanol v poměru 1 : 1. Nutností byla opakovaná filtrace přes filtrační papír i nylonový filtr, protože po krátké době docházelo k samovolnému zakalování vzorků.

7.1.2 Výsledky extrakce pod zpětným chladičem

Postup extrakce pod zpětným chladičem byl uveden v kapitole 6.4.2. Zkoušena byla po dobu 1 i 2 hodin. Užita byla rozpouštědla metanol a etanol. Ani v jednom případě nebyly získány čiré roztoky. Tato metoda byla tedy pro chromatografické měření nevhodná.

7.1.3 Výsledky extrakce ve vodní lázni

Kapitola 6.4.3 obsahuje popis extrakce ve vodní lázni. Jako rozpouštědla byla vybrána metanol a etanol. Testovány byly teploty vodní lázně 30 a 40 °C. Zkoušena byla i různá doba extrakce. Výsledkem byl vždy čirý roztok. Výhodou této metody byla nižší náročnost na filtraci, postačil filtrační papír.

7.2 Výsledky modelace chromatografických podmínek pro analýzu vitamínu E

7.2.1 Výsledky testování rozpustnosti standardu

Rozpustnost D,L- α -tokoferolu a D,L- α -tokoferolacetátu byla zkoušena v metanolu a etanolu, jak je uvedeno v kapitole 6.5.1. Standardy byly v obou činidlech zcela rozpustné. Pro následnou přípravu roztoků standardů byl používán metanol.

7.2.2 Výsledky měření na koloně Supelcosil LC 8

Postup práce je detailně popsán v kapitole 6.5.2. Na koloně Supelcosil LC 8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) byly proměřeny koncentrace standardů 100, 50 a 20 μ g.ml⁻¹. Detekce proběhla nejlépe při vlnových délkách 210, 230 a 254 nm. Při 280 nm byla odezva minimální a při 310 nm nebyla zaznamenána žádná. Při použití mobilní fáze metanolu o průtoku 0,8 ml.min⁻¹ byl retenční čas D,L- α -tokoferolu 26,2 minut a D,L- α -tokoferolacetátu 26,1 minut. Po zvýšení průtoku mobilní fáze na 1 ml.min⁻¹ byl odečten retenční čas D,L- α -tokoferolu 20,3 minut a D,L- α -tokoferolacetátu 20,4 minut. Lepších výsledků bylo dosaženo při obměně složení mobilní fáze na metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5.

7.2.3 Výsledky měření na koloně Ascentis C 18

Analýza D,L- α -tokoferolu a D,L- α -tokoferolacetátu na koloně Ascentis C 18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 6.5.3. Dávkovány byly roztoky standardů o koncentracích 20 a 100 μ g.ml⁻¹. Z nastavených vlnových délek se nejlépe jevily 210, 230, 254 a 270 nm. Retenční čas D,L- α -tokoferolu byl při průtoku metanolu 0,8 ml.min⁻¹ 26,1 minut, u D,L- α -tokoferolacetátu činil 26,1 minut.

7.2.4 Výsledky měření na koloně Supelcosil LC 18 DB

Separace proběhla na koloně Supelcosil LC 18 DB (250 x 4,6 mm; 5 μ m) podle principu z kapitoly 6.5.4. Změřeny byly vzorky D,L- α -tokoferolu o koncentracích 20 a 50 μ g.ml⁻¹. K analýze byl použit i roztok D,L- α -tokoferolacetátu o koncentraci 50 μ g.ml⁻¹. Z testovaných mobilních fází byla jako nevhodnější zvolena metanol : redestilovaná voda

v poměru 95 : 5. Nejsilnější signál byl snímán při vlnových délkách 210, 220, 230 a 254 nm. Při průtoku mobilní fáze $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byl retenční čas D,L- α -tokoferolu 26,2 minut a D,L- α -tokoferolacetátu 26,1 minut. Při průtoku $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ byl retenční čas určen u D,L- α -tokoferolu 20,4 minut a u D,L- α -tokoferolacetátu 20,3 minut.

7.2.5 Výsledky měření na koloně Discovery C 18

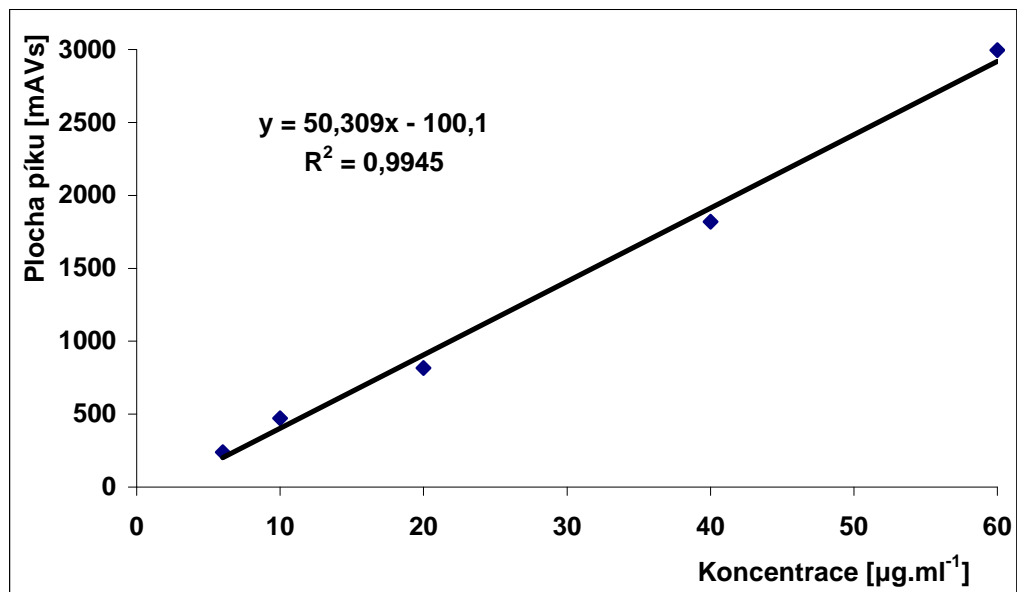
V kapitole 6.5.5 je popsán postup analýzy D,L- α -tokoferolu a D,L- α -tokoferolacetátu na koloně Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 μm). Proměřeny byly koncentrace 50 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejlepší detekce proběhla při vlnových délkách 210, 220 a 230 nm za použití mobilní fáze metanol a redestilovaná voda v poměru 95 : 5 o průtoku $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Odečten byl retenční čas D,L- α -tokoferolu 20,4 minut a D,L- α -tokoferolacetátu 20,4 minut. Tato kolona byla shledána jako nejvhodnější a byla použita pro následnou kalibraci a stanovení vitamínu E ve vzorcích obilovin.

7.3 Výsledky měření kalibrace vitamínu E

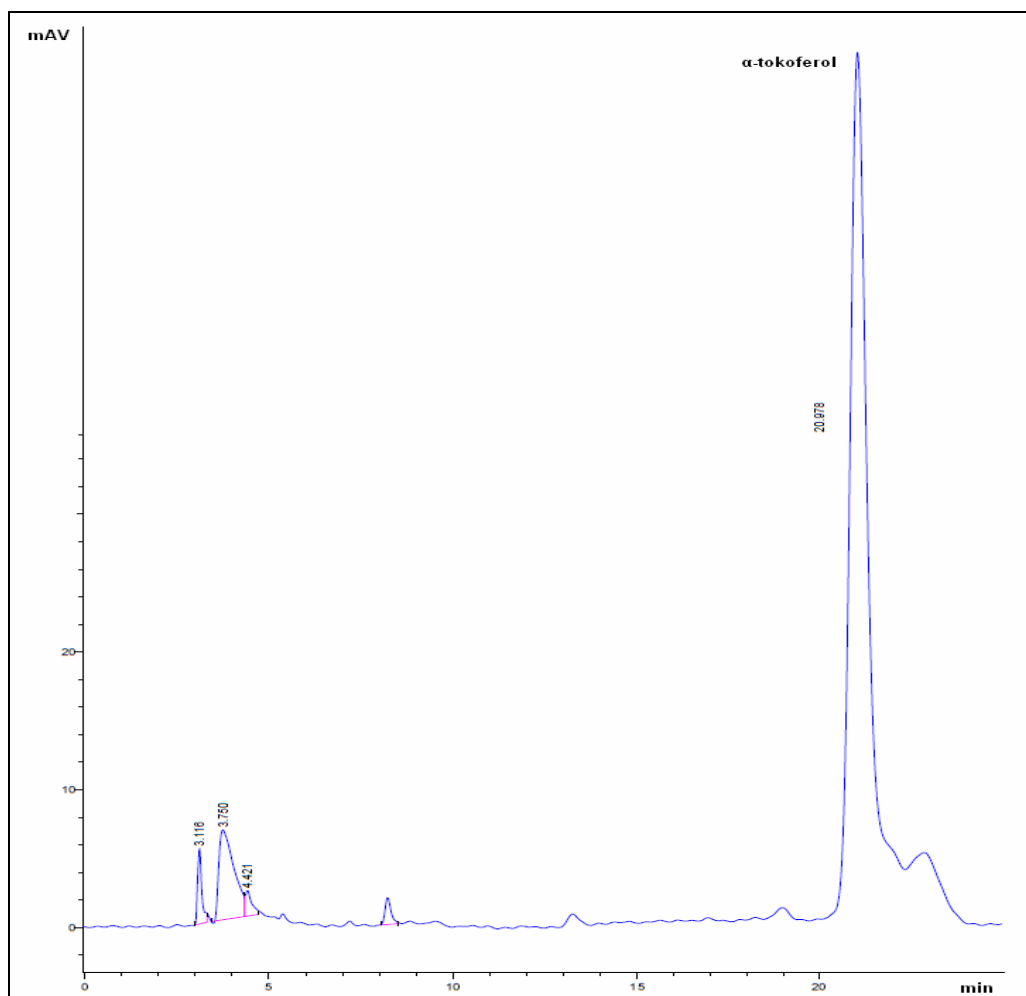
Podle postupu uvedeného v kapitole 6.6 byly změřeny velikosti plochy píků standardu D,L- α -tokoferolu o koncentracích 6, 10, 20, 40 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Z důvodu předpokládaného nízkého obsahu vitamínu E v obilovinách nebyly pro vytvoření kalibrační křivky uvažovány koncentrace standardu 100, 200 a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Detekce proběhla při vlnových délkách 210, 220 a 230 nm. Kalibrační křivky byly sestrojeny jako závislosti plochy píků (mAVs) na daných koncentracích ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 6, 7, 8 a grafech na obrázcích 18, 20 a 22. Při analýze mělo odezvu i použité rozpouštědlo metanol, jak je patrné z chromatogramů, které se nachází na obrázcích 19, 21 a 23. Jelikož byl ale metanol méně zadržován kolonou, nedošlo k vzájemnému ovlivňování.

Tab. 6 Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 210 nm

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha píku [mAVs]
6	242,0	239,0
	238,0	
	237,0	
10	470,3	471,8
	471,0	
	474,2	
20	818,0	815,8
	814,0	
	815,5	
40	1825,0	1820,2
	1802,2	
	1833,4	
60	2970,0	2994,7
	3032,0	
	2982,0	



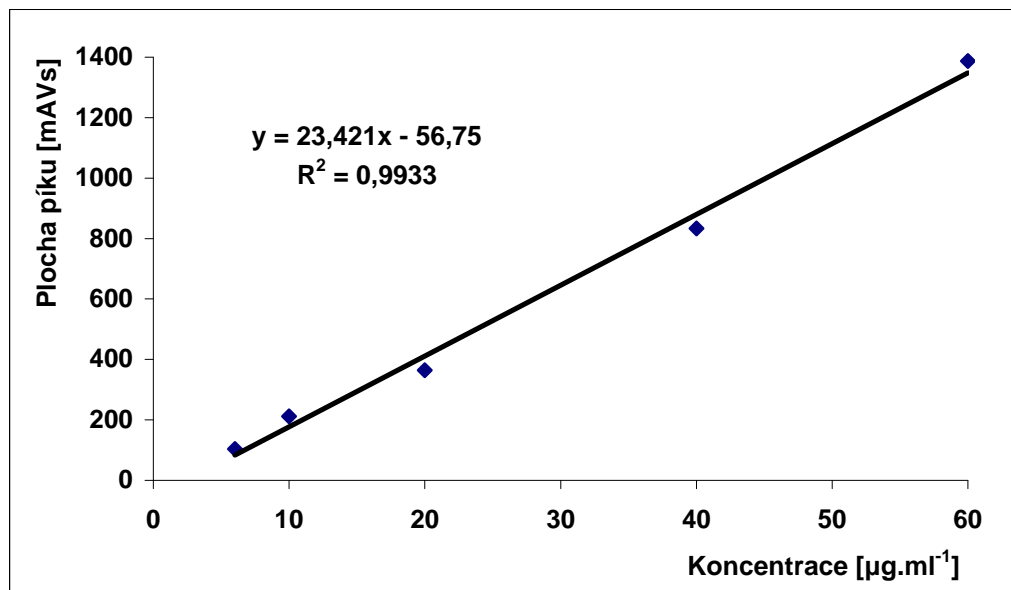
Obr. 20 Kalibrační křivka při vlnové délce 210 nm



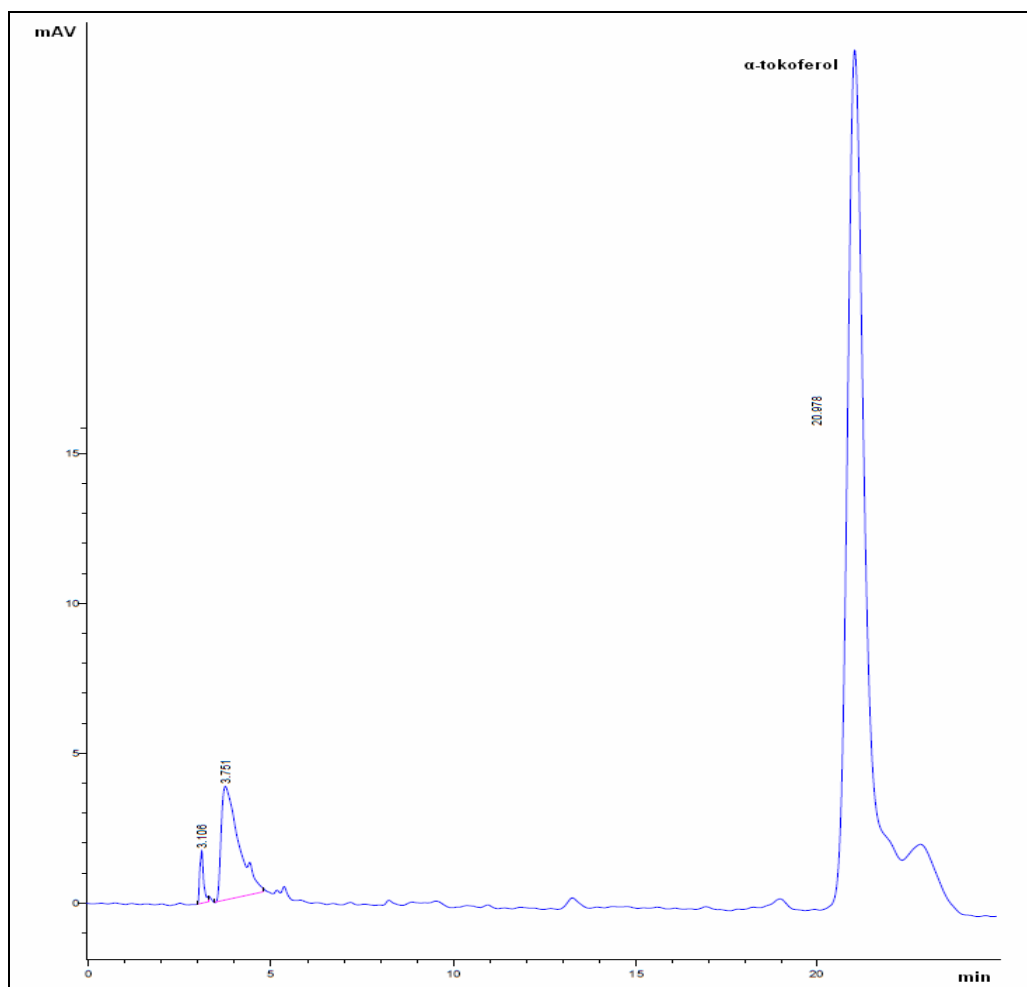
Obr. 21 Chromatogram D,L- α -tokoferolu o koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 210 nm

Tab. 7 Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 220 nm

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha píku[mAVs]
6	102,0	103,6
	103,0	
	106,0	
10	217,0	212,3
	214,9	
	205,0	
20	360,0	364,6
	368,5	
	365,2	
40	831,2	833,6
	822,6	
	847,0	
60	1383,0	1387,4
	1389,0	
	1390,3	



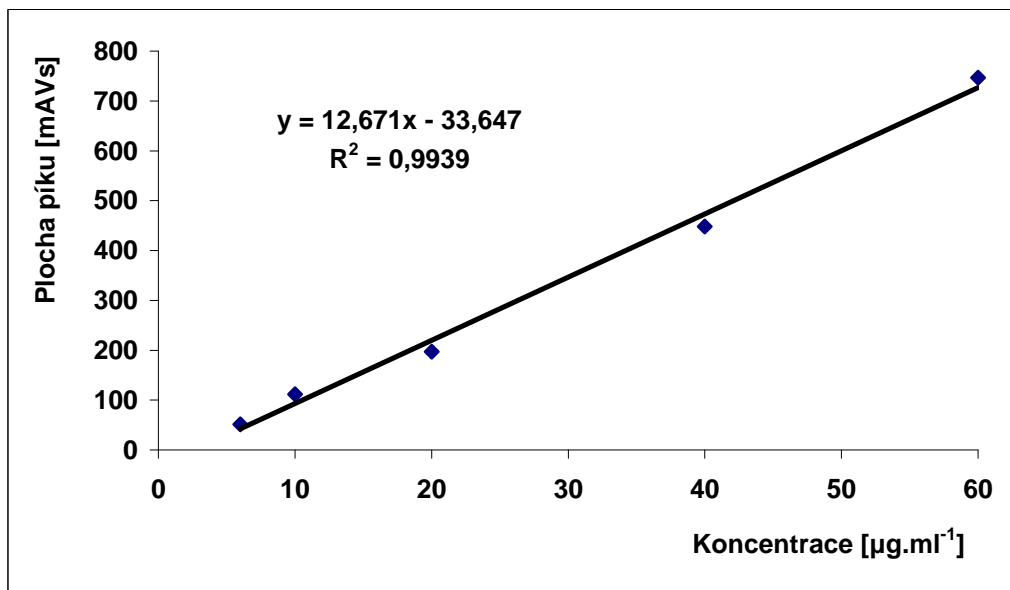
Obr. 22 Kalibrační křivka při vlnové délce 220 nm



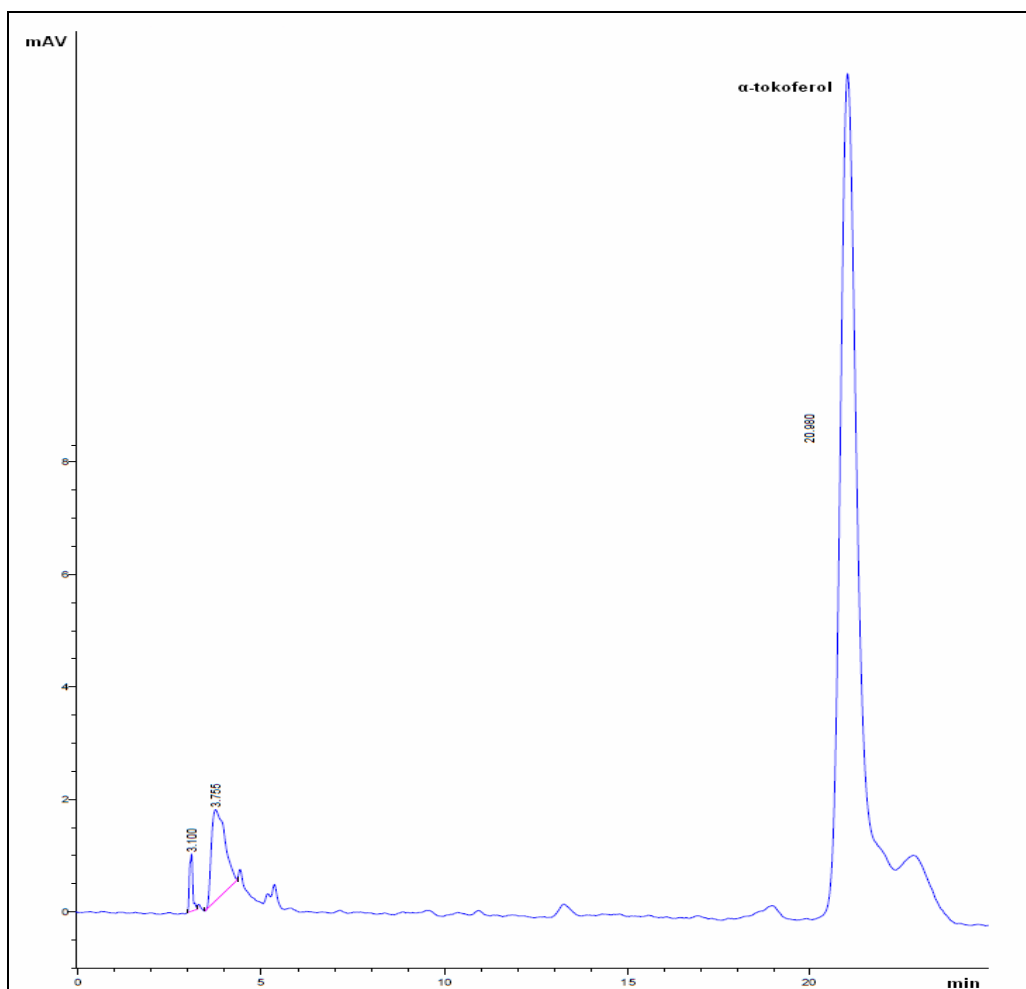
Obr. 23 Chromatogram D,L- α -tokoferolu o koncentraci $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 220 nm

Tab. 8 Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 230 nm

Koncentrace [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Plocha píku [mAVs]	Průměrná plocha píku [mAVs]
6	51,4	51,5
	52,0	
	51,0	
10	112,2	111,5
	111,7	
	110,7	
20	198,0	197,0
	197,6	
	195,4	
40	444,0	448,0
	447,3	
	452,6	
60	731,0	747,0
	764,5	
	745,6	



Obr. 24 Kalibrační křivka při vlnové délce 230 nm

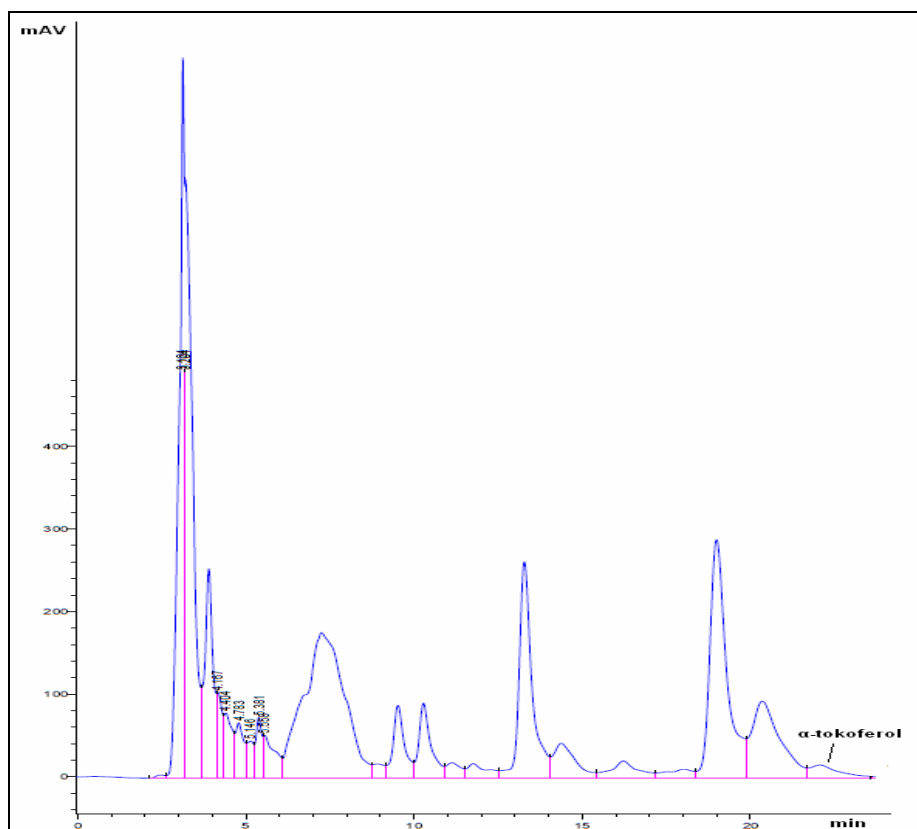


Obr. 25 Chromatogram D,L-α-tokoferolu o koncentraci 40 μg.ml⁻¹ při 230 nm

7.4 Výsledky stanovení vitamínu E ve vybraných vzorcích obilovin

7.4.1 Stanovení vitamínu E ve vzorcích získaných Soxhletovou extrakční metodou

Zrna vybraných obilovin byla upravena dle postupu uvedeného v kapitole 6.4.1. Proměřit bylo možno vzorky získané rozpuštěním odparků špaldového kernotta s metanolem a se směsí aceton : metanol (1 : 1) v metanolu. Chromatografické podmínky byly popsány v kapitole 6.7. Pík byl na chromatogramu viditelný v čase 20,2 minuty, ale díky jeho rozmytí nebylo možné danou plochu změřit. Použití kyseliny askorbové k ochraně vitamínu E nemělo kýžený efekt. Soxhletova extrakční metoda nepřinesla v záměru zjištění obsahu vitamínu E žádné výsledky.



bylo dosaženo při vlnové délce 210 nm. Odečtená plocha píku byla dosazena do rovnice regresní přímky kalibrační křivky a tím byla zjištěna koncentrace vitamínu E. Při výpočtech se vycházelo z kalibrační křivky sestavené pro vlnovou délku 210 nm, jejíž rovnice regrese má tvar $y = 50,309x - 100,1$.

Ze získaných koncentrací vitamínu E byl vypočten aritmetický průměr podle vztahu:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^n \frac{x_i}{n}$$

n - počet všech výsledků, \bar{x} - výsledné hodnoty

Míra přesnosti výsledků byla vyjádřena směrodatnou odchylkou, která byla zjištěna ze vztahu:

$$S.D. = \sqrt{\frac{1}{n} \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)}$$

n - počet všech výsledků, $x_i - \bar{x}$ - míra odchylky jednotlivého výsledku

Skutečný obsah vitamínu E byl vypočítán ze vzorce:

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{S.D.}{\sqrt{n}} \cdot t$$

\bar{x} - aritmetický průměr, $S.D.$ - směrodatná odchylka, n - počet všech výsledků, t - Studentův koeficient

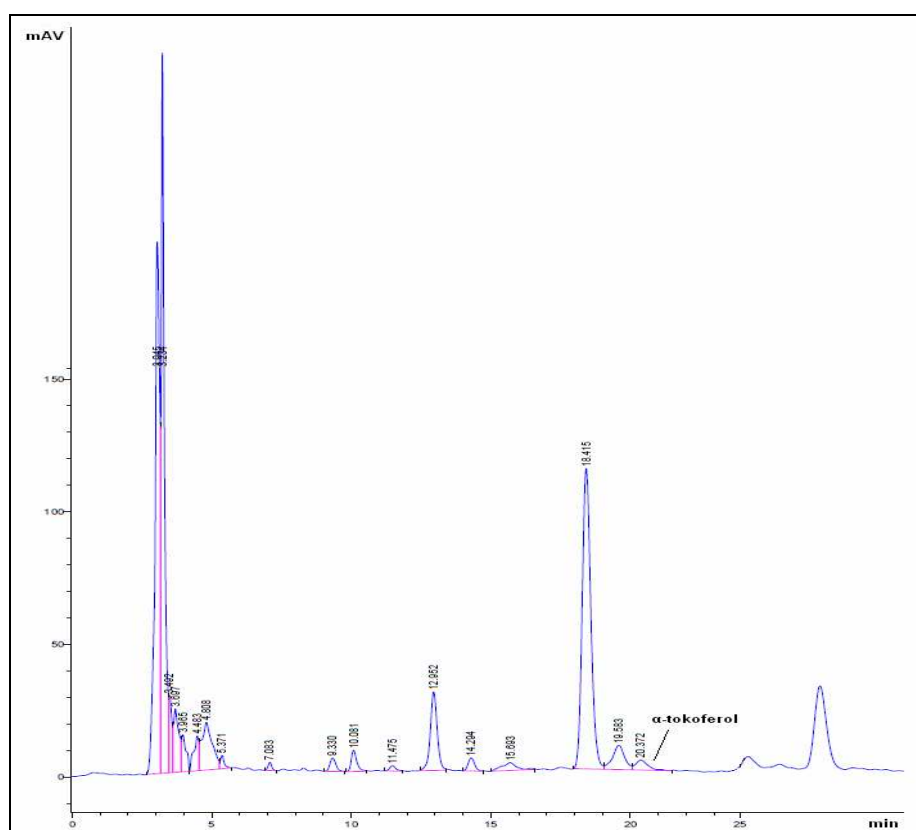
Hodnota Studentova koeficientu je při testované hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a při 5 stupních volnosti 2,571 [83]. Výsledky byly ověřeny metodou standardního přídatku.

Tab. 9 Obsah vitamínu E v Kamutu

Navážka vzorku [g]	Plocha píku [mAVs]	Obsah vitamínu E [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
10,0065	20,4	2,40	1,20
	20,1	2,39	1,19
10,0052	20,0	2,39	1,19
	19,8	2,39	1,19
10,0058	19,8	2,39	1,19
	20,1	2,39	1,19

Tab. 10 Průměrný obsah vitamínu E v Kamutu

Průměrný obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	S.D. [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	μ [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
1,19	0,004	1,19 \pm 0,004



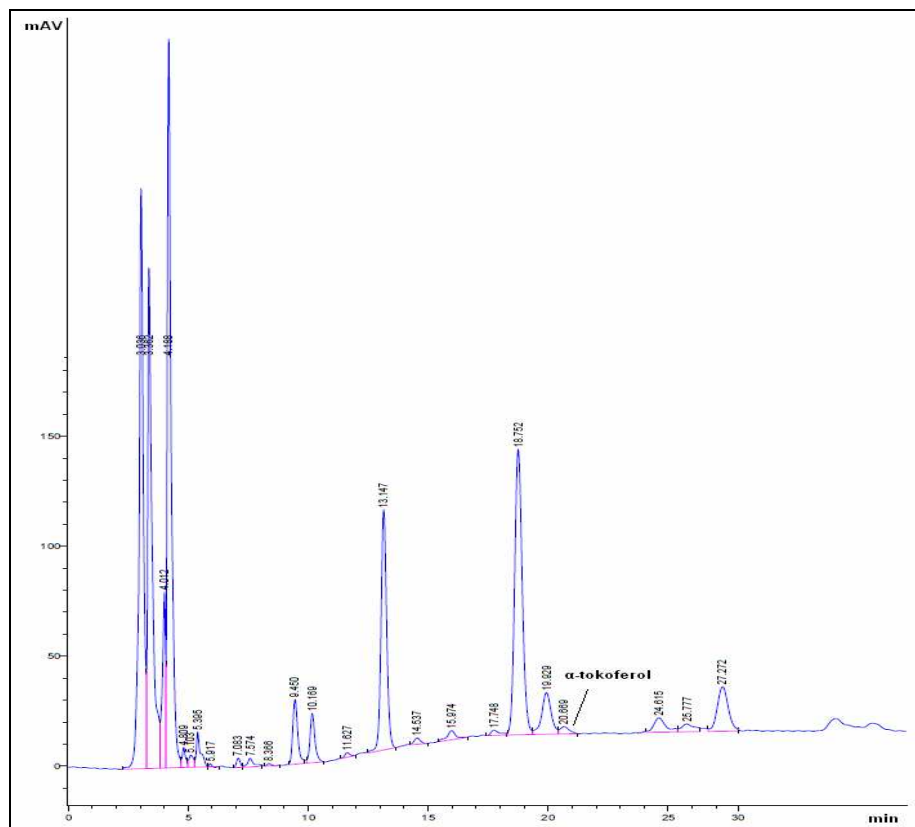
Obr. 27 Chromatogram Kamutu při vlnové délce 210 nm

Tab. 11 Obsah vitamínu E ve Špaldovém kernottu

Navážka vzorku [g]	Plocha píku [mAVs]	Obsah vitamínu E [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
10,0055	20,1	2,39	1,19
	20,4	2,40	1,20
10,0080	20,3	2,39	1,19
	20,4	2,40	1,20
10,0022	19,6	2,38	1,19
	20,0	2,39	1,19

Tab. 12 Průměrný obsah vitamínu E ve Špaldovém kernottu

Průměrný obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	S.D. [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	μ [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
1,19	0,005	1,19 \pm 0,005



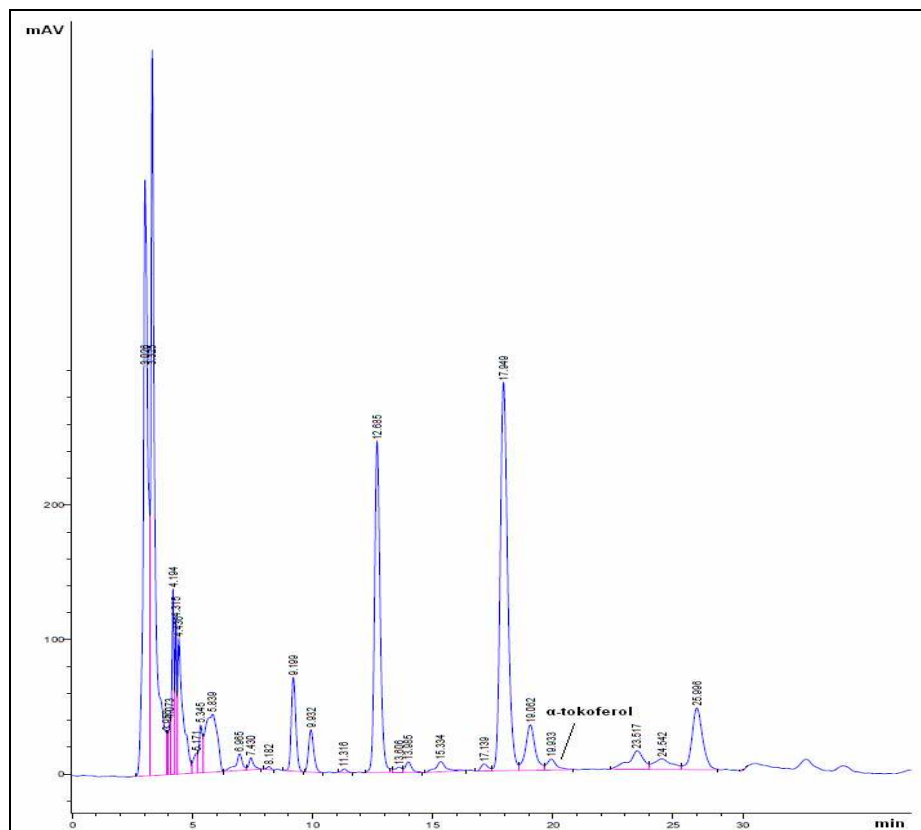
Obr. 28 Chromatogram Špaldového kernotta při vlnové délce 210 nm

Tab. 13 Obsah vitamínu E ve Špaldě loupané

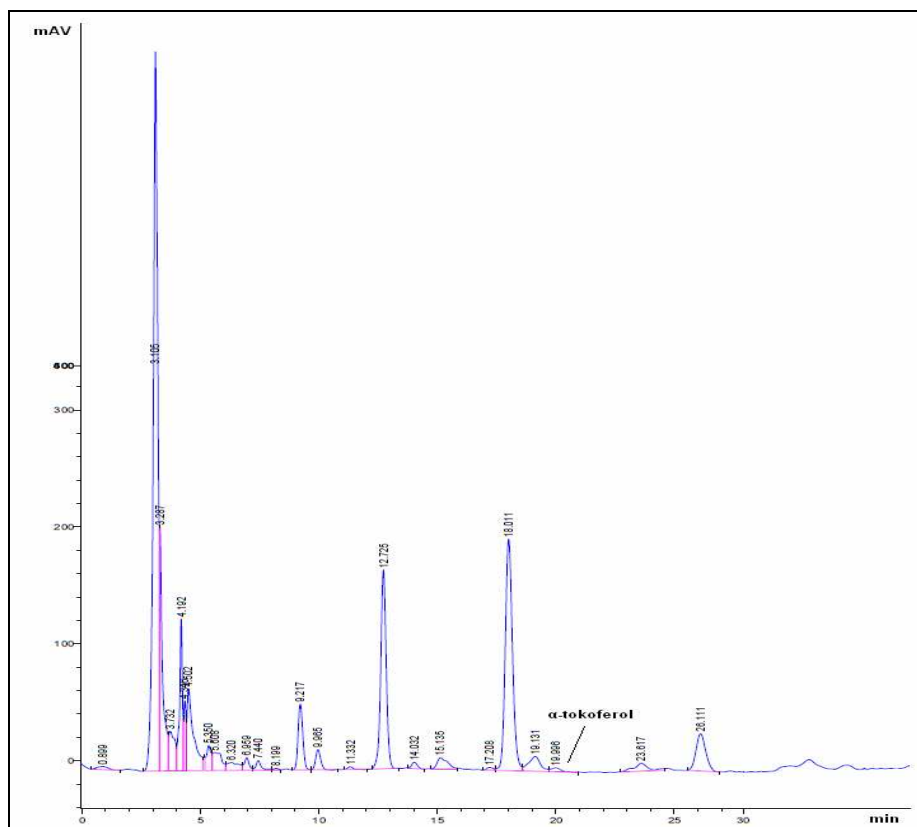
Navážka vzorku [g]	Plocha píku [mAVs]	Obsah vitamínu E [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
10,0047	31,5	2,62	1,31
	31,0	2,61	1,30
10,0023	29,6	2,58	1,29
	31,0	2,61	1,30
10,0012	29,6	2,58	1,29
	29,5	2,58	1,29

Tab. 14 Průměrný obsah vitamínu E ve Špaldě loupané

Průměrný obsah vitamínu E [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	S.D. [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]	μ [$\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$]
1,30	0,007	1,30 \pm 0,007



Obr. 29 Chromatogram Špaldy loupané při vlnové délce 210 nm



Obr. 30 Chromatogram Grünkernu při vlnové délce 210 nm

Ve vzorku Kamutu byl zjištěn průměrný obsah vitamínu E $1,19 \pm 0,004 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Špaldové kernotto obsahovalo v průměru $1,19 \pm 0,005 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ vitamínu E. Ve Špaldě loupané byla detekována průměrná koncentrace vitamínu E $1,30 \pm 0,007 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Výrobek Grünkern obsahoval vitamínu E velice málo. Přesné množství nebylo možno určit, neboť se nacházelo pod hranicí detekce.

Koncentrace vitamínu E v kamutu by měla být dle uvedených publikací vyšší než v běžné pšenici, u které se udává množství $1,0$ až $1,2 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ [84, 85, 86]. Jiný zdroj uvádí u pšenice obsah $1,19 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ [87]. Přímo pro kamut byla vyhledána hodnota $1,2 \pm 0,458 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ [88]. Literatura poskytuje informace i o obsahu vitamínu E ve špaldě, a to v průměru $1,49 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ [89]. Zveřejněny byly také nutriční hodnoty grünkernu, koncentrace vitamínu E činí $0,3 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ [90]. Složení špaldového kernotta nebylo nalezeno. Obsah vitamínu stanovený ve vzorku Kamutu byl srovnatelný s údaji, které poskytují publikované studie. Mírný rozdíl mezi hodnotami nastává u Špaldy loupané.

Provedeným měřením nebyl prokázán vyšší obsah vitamínu E u obilovin vypěstovaných v ekologickém zemědělství.

Chemické složení zrna ale kolísá podle odrůdy, doby setí, hnojení, agronomicky klimatických podmínek a dalších činitelů [91].

K úbytku koncentrace vitamínů dochází i během skladování obilovin [92]. Nižší obsah vitamínu E ve Špaldě loupané mohl být tedy způsoben také blízcím se koncem minimální trvanlivosti.

Odlišnost zjištěného obsahu vitamínu E od skutečného množství v daných obilovinách mohla být způsobena i přípravou vzorku, zejména zahřevem zrn při mletí a odběrem nestejnorodých částí rozdrčené hmoty. Obsah vitamínu totiž závisí také na podílu obalových vrstev, endospermu a klíčku. Vitamin E se ve značném množství vyskytuje zejména v klíčcích [52]. Vliv mohla mít i samotná degradace vitamínu v roztoku mezi jednotlivými chromatografickými měřeními i přes provedená opatření, jako byla např. snížená teplota či temno.

Nízký obsah vitamínu E v Grünkernu pravděpodobně zapříčinil způsob jeho výroby z pšenice špaldy. Grünkern totiž vzniká sušením a uzením ještě zelených zrn.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo izolovat vitamin E z obilovin, nalézt optimální chromatografické podmínky pro jeho analýzu a pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie stanovit jeho množství ve vybraných vzorcích obilovin vypěstovaných v ekologickém zemědělství.

K extrakci vitaminu byla vyzkoušena Soxhletova metoda, použití zpětného chladiče a vodní lázně. Jako nejvhodnější byla vyhodnocena extrakce ve vodní lázni. Kvalita extraktu získaného Soxhletovou metodou byla závislá na užitém rozpouštědle, vhodný byl metanol a směs aceton : metanol v poměru 1 : 1. Extrakcí pod zpětným chladičem se nepodařilo připravit vzorky, které by mohly být využity k následnému chromatografickému měření.

K nalezení chromatografických podmínek pro stanovení vitaminu E byly použity standardy D,L- α -tokoferol a D,L- α -tokoferolacetát. Analýza probíhala na aparatuře Hewlett Packard 1100 s detektorem UV/VIS DAD. Vyhodnocení bylo zajištěno programem ChemStation Instrument 1. Separace standardů byla provedena na kolonách Supelcosil LC 8, Ascentis C 18, Supelcosil LC 18 DB a Discovery C 18. Nejlepších výsledků bylo dosaženo měřením na koloně Discovery C 18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) za použití mobilní fáze metanol : redestilovaná voda v poměru 95 : 5 o průtoku 1 ml.min⁻¹. Nejsilnější signál byl snímán při vlnových délkách 210, 220 a 230 nm. Termostat kolony byl nastaven na 30 °C. Tyto parametry byly nastaveny při měření kalibrační křivky i obsahu vitaminu E v jednotlivých vzorcích obilovin.

Pro vytvoření kalibrační křivky byl vybrán D,L- α -tokoferol. Při následných výpočtech se vycházelo z regresní přímky obdržené při vlnové délce 210 nm.

Za účelem stanovení množství vitaminu byly zvoleny výrobky Kamut, Špaldové kernotto, Špalda loupaná a Grünkern. Proměřením vzorků získaných Soxhletovou extrakční metodou nemohl být z důvodu dosažení špatného píku obsah vitaminu určen. Lze doporučit spíše extrakci metanolem ve vodní lázni o teplotě 40 °C po dobu 3 hodin. Ve vzorku Kamutu byla poté zjištěna průměrná koncentrace vitaminu E $1,19 \pm 0,004$ mg.100g⁻¹. Špaldové kernotto obsahovalo v průměru $1,19 \pm 0,005$ mg.100g⁻¹. Průměrný obsah vitaminu E ve špaldě loupané činil $1,30 \pm 0,007$ mg.100g⁻¹. V Grünkernu se vitamin E vyskytoval v malém množství, které se nepodařilo přesně stanovit, jeho obsah byl pod hladinou detekce.

Pro srovnání byly v odborné literatuře vyhledány údaje o obsahu vitamínu E v kamutu $1,2 \pm 0,458 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, ve špaldě $1,49 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ a grünkernu $0,3 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. U Kamutu je naměřená hodnota srovnatelná s publikovanou koncentrací. U Špaldy loupané dochází k mírné odlišnosti, která mohla být způsobena končící dobou minimální trvanlivosti výrobku. Příčinou nižšího obsahu vitamínu E v Grünkernu je pravděpodobně postup při jeho výrobě, získává se tepelnou úpravou zrn pšenice špaldy sbírané již v mléčné zralosti. Skutečnost, že byly pro stanovení použity obiloviny v bio kvalitě, neměla na koncentraci vitamínu E žádný vliv.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VÁVROVÁ, J. *Vitaminy a stopové prvky 2007*, Pardubice: Česká společnost klinické biochemie, 2007
- [2] HLÚBIK, P., OPLTOVÁ, L. *Vitaminy*, Praha: Grada Publishing, 2004
- [3] MERKUNOVÁ, A., OREL, M. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*, Praha: Grada Publishing, 2008
- [4] DOSTÁL, J., PAULOVÁ, H., SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. *Biochemie pro bakaláře*, Brno: Masarykova Univerzita, 2003
- [5] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie 3*, Praha: Akademie věd České republiky, 1993
- [6] LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny II. díl*, Praha: Karolinum, 2004
- [7] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II*, Zlín: UTB Academia centrum Zlín, 2006
- [8] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*, Praha: SNTL 1983
- [9] WILHELM, Z. *Stručný přehled fyziologie člověka pro bakalářské studijní programy*, Brno: Masarykova Univerzita, 2005
- [10] BRÁZDOVÁ, Z. *Výživa člověka*, Vyškov: VVŠ PV, 1995
- [11] SEN, C., KHANNA, S., ROY, S. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols, *Life Sciences*, Vol. 78, Issue 18, 2006
- [12] COSIDINE, G. D. *Van Nostrand's Encyclopedia of Chemistry*, New Jersey: Wiley, 2005
- [13] EITENMILLER, R. *Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis*, Athens: The University of Georgia, 2004
- [14] PACKER, L., FUCHS, J. *Vitamin E in Health and Disease*, New York: Marcel Dekker, 1993

- [15] DOUŠA, M. *Vitamin E* [online]. 2004 [cit. 2009-11-02]. Dostupný z WWW: <http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/ch_vitaminE.htm>
- [16] STONE, T., DARLINGTON, G. *Pills, Potions and Poisons: How Drugs Work*, Oxford: Oxford University Press, 2000
- [17] LANGE - ERNST, M. E. *Vitamin E und Magnesium*, München: Midena Verlag, 2009
- [18] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, Tábor: OSSIS, 1999
- [19] BALCH, P. A. *Prescription for Nutritional Healing*, London: Penguin Group, 2006
- [20] ARNDT, T. *Vitamin E* [online]. 2008 [cit. 2009-11-02]. Dostupný z WWW: <<http://www.celostnimediceina.cz/vitamin-e-tocoferolum-aceticum-tokoferol.htm>>
- [21] ZADÁK, Z. *Magnezium a další minerály, vitaminy a stopové prvky ve službách zdraví*, Břeclav: Presstempus, 2006
- [22] KIRSCHMANN, J. D. *Nutrition Almanac*, New York: McGraw-Hill, 2007
- [23] MINDELL, E. *Vitamin Bible for the 21st Century*, New York: Warner Books, 2000
- [24] BURIANOVÁ, T. *Vitamíny rozpustné v tucích* [online]. 2004 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.ordinace.cz/clanek/vitaminy-rozpustne-v-tucich>>
- [25] SVAČINA, Š. *Klinická dietologie*, Praha: Grada Publishing, 2008
- [26] MACHLIN, L. J. *Handbook of Vitamins*, New York: Marcel Dekker, 1984
- [27] LEDVINA, M. *Biochemie pro posluchače pedagogické fakulty*, Hradec Králové: Gaudeamus, 1998
- [28] ŠTÍPEK, S. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*, Praha: Grada Publishing, 2000
- [29] ZADÁK Z. *Výživa v intenzivní péči*, Praha: Grada Publishing, 2008
- [30] UNGER - GÖBEL, U. *Vitamine*, München: Gräfe und Unzer, 2002
- [31] MINDELL, E., MUNDIS, H. *Earl Mindell's New Vitamin Bible*, New York: Warner

- Books, 2004
- [32] ŠÍCHO, V., VODRÁŽKA, Z., KRÁLOVÁ, B. *Potravinářská biochemie*, Praha: SNTL, 1981
- [33] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy – výkladový slovník*, Praha: VŠCHT, 2004
- [34] Vyhláška č. 330/2009 Sb. o označování výživové hodnoty potravin, ve znění pozdějších předpisů
- [35] DOSTÁL, J. *Medical chemistry II*, Brno: Masarykova Univerzita, 2006
- [36] Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, Washington: National Academy Press, 2000
- [37] DEVEREUX, G. TUNER, S. W., CRAIG, L. C. et al. Low Maternal Vitamin E Intake During Pregnancy is Associated with Asthma in 5-year-old Children, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol. 174, 2006
- [38] SLÍVA, J., MINÁRIK, J. *Doplňky stravy*, Praha: Triton, 2009
- [39] MICHALOVÁ, I. *Průvodce spotřebitele - Doplnky stravy*, Praha: Sdružení českých spotřebitelů, 2007
- [40] BRAUNSTEIN, M. H. *Vitamin E: new research*, New York: Nova Science Publisher, 2006
- [41] Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006 o přidávání vitaminů a minerálních látek a některých dalších látek do potravin, ve znění pozdějších předpisů
- [42] *Co je bio?* [online]. [cit. 2009-11-10].
Dostupný z WWW: <<http://www.biorganic.cz/biopotraviny/co-je-bio>>
- [43] PRŮŠOVÁ, J., ZEMANOVÁ, H. *BIOPOTRAVINY, spotřebitelské otázky a odpovědi*, Praha: PRO - BIO LIGA ochrany spotřebitelů potravin a přátel ekologického zemědělství, 2004

- [44] *Bioprodukt* [online]. 2005 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bioprodukt>>
- [45] *Loga pro ekologické zemědělství* [online]. 2010 [cit. 2010-04-28].
Dostupný z WWW:
<<http://eagri.cz/public/eagri/zemedelstvi/ekologicke-zemedelstvi/loga-a-znaceni/>>
- [46] ČERVENKA, J., KOVÁŘOVÁ, K. *Biopotraviny*, Praha: Česká zemědělská univerzita, 2005
- [47] ŠÁNOVÁ, P. *Cvičení z biopotravin*, Praha: Česká zemědělská univerzita, 2007
- [48] *Biopotraviny* [online]. 2004 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:
<<http://eagri.cz/public/eagri/potraviny/biopotraviny>>
- [49] *Počet biofarem v ČR vzrůstá* [online]. 2009 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:
<<http://www.agris.cz/vyhledavac/detail.php?id=164410&iSub=518&sHighLight=>>>
- [50] *Obilniny* [online]. 2005 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:
<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Obiloviny>>
- [51] ŽDÁRSKÝ, J., BENDA, V. *Biologie II.*, Praha: VŠCHT, 1993
- [52] KOPÁČOVÁ, O. *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*, Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007
- [53] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J., KOHOUT, P. *Základy výživy*, Praha: Svoboda Servis, 2002
- [54] PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., HRUŠKOVÁ, M. *Cereální chemie a technologie I: cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin*, Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004
- [55] HRABĚ, J., ROP, O., HOZA, I. *Technologie výroby potravin rostlinného původu*, Zlín: UTB Academia centrum Zlín, 2006
- [56] *Rostlinné komodity* [online]. 2009 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:

- <<http://eagri.cz/public/eagri/zemedelstvi/roslinne-komodity/>>
- [57] *Průběh sklizně* [online]. 2009 [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW:
<<http://eagri.cz/public/eagri/zemedelstvi/roslinne-komodity/obiloviny/prubeh-sklizne/>>
- [58] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*, Ostrava: Klouda Pavel, 2003
- [59] POUŠEK, L. a kol. *Přehled biochemie člověka*, Praha: České vysoké učení technické, 2008
- [60] JANČÁŘOVÁ, I. *Analytická chemie*, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003
- [61] COUFAL, P. *High Performance Liquid Chromatography* [online]. 2004 [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>>
- [62] KARLÍČEK, R. a kol. *Analytická chemie pro farmaceuty*, Praha: Karolinum, 2001
- [63] ŠTULÍK, K. a kol. *Analytické separační metody*, Praha: Karolinum, 2004
- [64] HELÁN, V. a kol. *Analýza organických látek*, Český Těšín: 2 THETA, 2005
- [65] STÖRMANN, R. *Scheme of a HPLC System* [online]. 2003 [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW:
<<http://www.uft.uni-bremen.de/chemie/Chromatography/chrom065.htm>>
- [66] PACÁKOVÁ, V., ŠTULÍK, K. *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986
- [67] DOUŠA, M. *Základy separačních metod se zaměřením na HPLC*, Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2002
- [68] GRATZFELD-HÜSGEN, A., SCHUSTER, R. *HPLC for Food Analysis*, Germany: Agilent Technologies Company, 2001
- [69] *Zásobník mobilní fáze* [online]. [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW:
<<http://www.ecomsro.cz/cz/s32-produkty/uprava-mf/c10-zasobniky>>

- [70] OPEKAR, F. a kol. *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*, Praha: Karolinum, 2002
- [71] BOSÁKOVÁ, Z. *Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii* [online]. 2008 [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW: <<http://web.natur.cuni.cz/analchem/bosakova/hplc5.pdf>>
- [72] HANAI, T. *HPLC: A Practical Guide*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999
- [73] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*, New Jersey: Wiley, 2006
- [74] DOUŠA, M. *Chromatografická kolona* [online]. 2009 [cit. 2009-11-25]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/hplc_column.html>
- [75] CHURÁČEK, J. *Separace látek*, Praha: SNTL, 1986
- [76] POUSTKA, J. *Detektory v kapalinové chromatografii* [online]. 2007 [cit. 2009-11-25]. Dostupný z WWW: <<http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM%20HPLC%20DETEKTORY%20092007.pdf>>
- [77] DOUŠA, M. *Elektrochemické HPLC detektory* [online]. 2009 [cit. 2009-11-22]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html>
- [78] PAPADOYANNIS, I. N. *HPLC in Clinical Chemistry*, New York: Marcel Dekker, 1990
- [79] OLIVER, R. W. A. *HPLC of Macromolecules: A Practical Approach*, Oxford: Oxford University Press, 1998
- [80] BIDLINGMEYER, B. A. *HPLC Methods and Applications*, New York: Wiley, 1992
- [81] BROWN, H. A. *Methods in Enzymology*, London: Academic Press, 2007
- [82] DOUŠA, M. *Problematika stanovení lipofilních vitaminů v krmivech a potravinách metodou HPLC* [online]. 2004 [cit. 2010-01-15]. Dostupný z WWW: <http://www.hplc1.sweb.cz/Vitamin/lipofil_problem.html>

- [83] SOMMER, L. *Teoretické základy analytické chemie III.*, Brno: Chemická fakulta Vysokého učení technického v Brně, 1995
- [84] SHI, J., MAZZA, G., LE MAGUER, M. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, Boca Raton USA: CRC Press, 2002
- [85] WITTENBERG, M. M. *New Good Food: Essential Ingredients for Cooking and Eating Well*, Berkeley: Ten Speed Press, 2007
- [86] UNDERKOFFLER, R. L. *Living Cuisine: The Art and Spirit of Raw Foods*, New York: Avery Publishing Group, 2003
- [87] DOUŠA, M. *Vyjadřování obsahu vitamínu E v krmivech* [online]. 2004 [cit. 2010-01-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.hplc1.sweb.cz/Report/Tocoferols.htm>>
- [88] *Kamut - Nutritional Values* [online]. 2010 [cit. 2010-02-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.kamut.com/userfiles/2008%20Nutritional%20Values%20Table.pdf>>
- [89] GRELA, E. R. *Nutrient Composition and Content of Antinutritional Factors in Spelt Cultivars*, Lublin: University of Agriculture, 1996
- [90] *Nährwerte - Grünkern* [online]. 2006 [cit. 2010-02-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.foodplaner.de/naehrwerte-627-gruenkern.html>>
- [91] KUČEROVÁ, J. *Technologie cereálií*, Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004
- [92] McKEVITH, B. *Nutritional Aspect of Cereals*, London: British Nutrition Foundation, 2004
- [93] *Přírodní vitamin E* [online]. 2010 [cit. 2010-03-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.favea-trade.cz/prirodni-vitamin-e-30-tbl-22>>

[94] *Výživný denní krém s vitamínem E* [online]. 2010 [cit. 2010-03-05].

Dostupný z WWW: <<http://pletove-kremy.heureka.cz/la-chevre-le-chaton-vyzivny-denni-krem-s-vitaminem-e-50-g/>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

VLDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě
LDL	Lipoproteiny o nízké hustotě
HDL	Lipoproteiny o vysoké hustotě
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
EHS	Evropské hospodářské společenství
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
EU	Evropská unie
SOT	Společná organizace trhu
GC	Plynová chromatografie
GSC	Adsorpční plynová chromatografie
GLC	Rozdělovací plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
LSC	Adsorpční kapalinová chromatografie
LLC	Rozdělovací kapalinová chromatografie
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
PC	Papírová chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
GPC	Gelová permeční chromatografie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie

MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
NP	Chromatografie v systémech s normálními fázemi
RP	Chromatografie v systémech s převrácenými fázemi
UV	Ultrafialová oblast
VIS	Viditelná oblast
DAD	Detektor s diodovým polem
FLD	Fluorimetrický detektor
RI	Refraktometrický detektor
ECD	Elektrochemický detektor
MS	Hmotnostní detektor

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1	Tokoferoly	14
Obr. 2	Tokotrienoly	15
Obr. 3	Reakce tokoferolu s lipoperoxylovým radikálem	18
Obr. 4	Antioxidační systém	18
Obr. 5	Biozebra.....	23
Obr. 6	Evropské bio logo	23
Obr. 7	Podélný řez pšeničným zrnem	26
Obr. 8	Podíl jednotlivých komodit na sklizni obilovin v ČR v roce 2009	28
Obr. 9	Uspořádání HPLC.....	33
Obr. 10	Zásobník mobilní fáze	34
Obr. 11	Dávkování vzorku.....	35
Obr. 12	Sestava kolony	36
Obr. 13	Předkolona	37
Obr. 14	Detektor s diodovým polem.....	38
Obr. 15	HPLC sestava HP 1100	43
Obr. 16	Kamut	44
Obr. 17	Špaldové kernotto	45
Obr. 18	Grünkern	46
Obr. 19	Špalda loupaná.....	47
Obr. 20	Kalibrační křivka při vlnové délce 210 nm	57
Obr. 21	Chromatogram D,L- α -tokoferolu o koncentraci 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 210 nm.....	57
Obr. 22	Kalibrační křivka při vlnové délce 220 nm	59
Obr. 23	Chromatogram D,L- α -tokoferolu o koncentraci 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 220 nm.....	59
Obr. 24	Kalibrační křivka při vlnové délce 230 nm	61
Obr. 25	Chromatogram D,L- α -tokoferolu o koncentraci 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při 230 nm.....	61
Obr. 26	Chromatogram Špaldového kernotta při vlnové délce 220 nm	62
Obr. 27	Chromatogram Kamutu při vlnové délce 210 nm	64
Obr. 28	Chromatogram Špaldového kernotta při vlnové délce 210 nm	65
Obr. 29	Chromatogram Špaldy loupané při vlnové délce 210 nm.....	66
Obr. 30	Chromatogram Grünkernu při vlnové délce 210 nm	67

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Koncentrace vitamínu E u člověka	17
Tab. 2	Obsah vitamínu E ve vybraných potravinách	20
Tab. 3	Sklizeň obilovin v ČR v roce 2009.....	28
Tab. 4	Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s ostatními separačními metodami	31
Tab. 5	Charakteristika HPLC detektorů.....	39
Tab. 6	Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 210 nm	56
Tab. 7	Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 220 nm	58
Tab. 8	Kalibrace vitamínu E při vlnové délce 230 nm	60
Tab. 9	Obsah vitamínu E v Kamutu	64
Tab. 10	Průměrný obsah vitamínu E v Kamutu.....	64
Tab. 11	Obsah vitamínu E ve Špaldovém kernottu	65
Tab. 12	Průměrný obsah vitamínu E ve Špaldovém kernottu.....	65
Tab. 13	Obsah vitamínu E ve Špaldě loupané	66
Tab. 14	Průměrný obsah vitamínu E ve Špaldě loupané	66

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Přípravky s vitamínem E

Příloha II: HPLC příslušenství

Příloha III: Detektory pro HPLC

PŘÍLOHA P I: PŘÍPRAVKY S VITAMINEM E

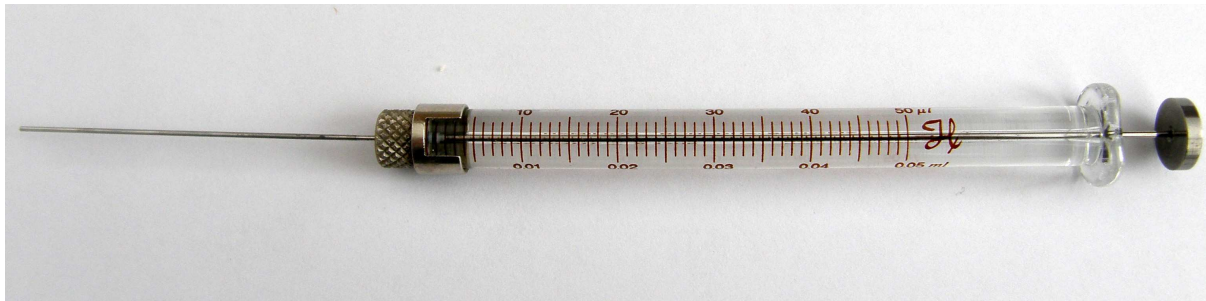


Obr. Přírodní vitamin E [92]

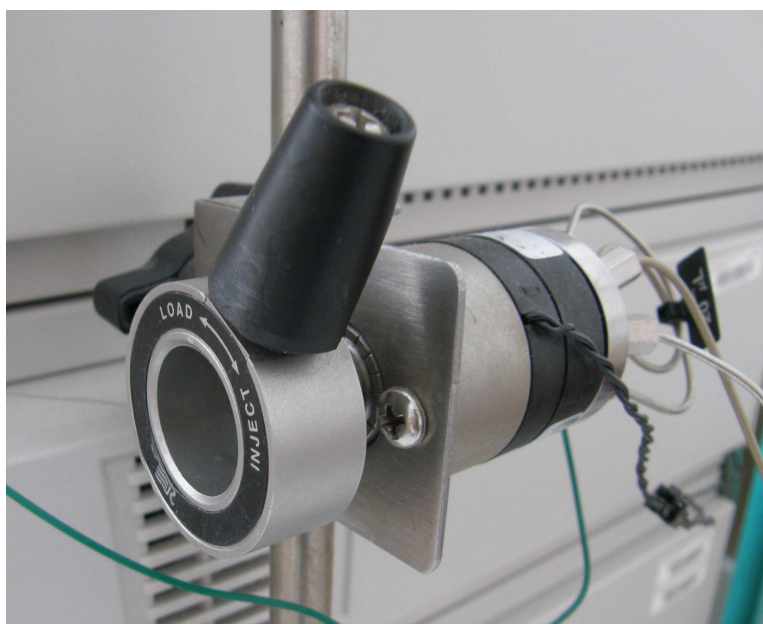


Obr. Denní krém s vitaminem E [93]

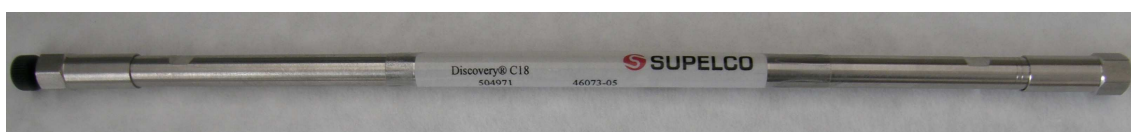
PŘÍLOHA P II: HPLC PŘÍSLUŠENSTVÍ



Obr. Dávkovací stříkačka Hamilton

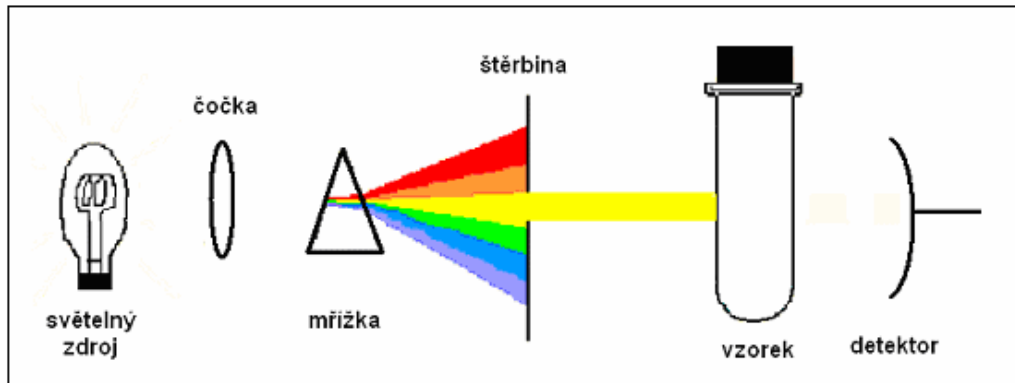


Obr. Ventil dávkovací smyčkový

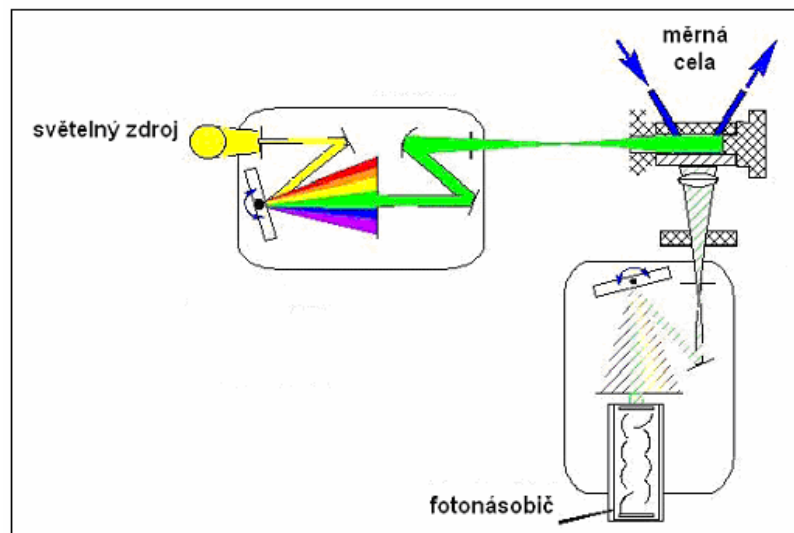


Obr. Kolona Discovery C 18

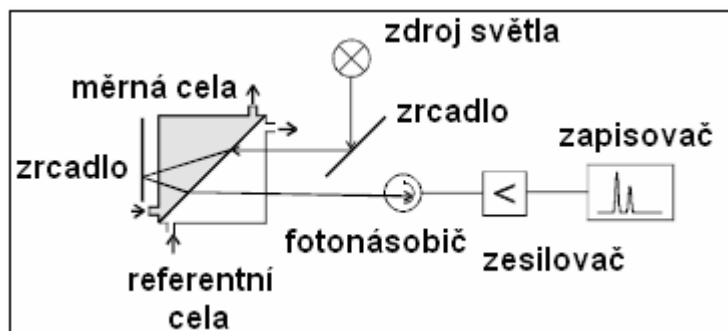
PŘÍLOHA P III: DETEKTORY PRO HPLC



Obr. Fotometrický detektor [76]



Obr. Fluorimetrický detektor [76]



Obr. Refraktometrický detektor [61]

