

## ABSTRAKT (CZ)

Proteinogenní aminokyseliny patří mezi základní stavební jednotky živých organismů. Proto byl v poslední době výzkum v metabolomice zaměřen na vývoj rychlých a citlivých analytických metod pro stanovení aminokyselin. Tato práce obsahuje dvě studie popisující vývoj vysoce účinných separačních metod pro kvantifikaci aminokyselin.

V první studii byla vyvinuta metoda kapilární elektroforézy pro stanovení aminokyselin v rostlinách tabáku. Nedílnou součástí této studie byla optimalizace extrakce aminokyselin z rostlinného materiálu. Extrakce byla optimalizována postupem “design of experiments” (DoE), pomocí kterého byly vyhodnoceny faktory ovlivňující výtěžek extrakce aminokyselin. Nejdůležitějšími faktory byly objem a koncentrace extrakčního činidla (kyselina chlorovodíková), jejichž optimální hodnoty byly určeny pomocí “response surface methodology” (RSM). Poté byly aminokyseliny separovány pomocí kapilární elektroforézy s bezkontaktní vodivostní detekcí a stanoveny za použití kalibrace s vnitřním standardem, což přispělo ke zlepšení přesnosti metody.

Druhá studie byla zaměřena na vývoj metody pro stanovení aminokyselin v lidské plasmě pomocí superkritické fluidní chromatografie. Jedním z cílů této studie bylo zvýšit rozpustnost aminokyselin v mobilní fázi bohaté na CO<sub>2</sub>. Nejdříve byla zvýšena polarita mobilní fáze (CO<sub>2</sub>/methanol) přidávkem vody a mravenčanu amonného. Polarita aminokyselin byla zároveň snížena derivatizací 1-chlorbutanem. Derivatizace zvýšila rozpustnost aminokyselin v mobilní fázi, proto se zlepšily tvary píků aminokyselin. Aminokyseliny byly separovány pomocí superkritické fluidní chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Stanovení aminokyselin v lidské plasmě bylo provedeno pomocí kalibrace s deuterovanými standardy aminokyselin.

V této práci byly obě metody porovnány z hlediska jejich separační účinnosti, mezi stanovitelnosti a provozních nákladů. Použití kapilární elektroforézy pro stanovení aminokyselin zajistilo lepší separační účinnost. Avšak použití superkritické fluidní chromatografie umožnilo stanovení až o pět řádů nižších koncentrací aminokyselin, navíc byla tato metoda podstatně rychlejší. Využití superkritické fluidní chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ovšem klade vyšší nároky nejen na zkušenosti operátora, ale i na stabilní laboratorní prostředí. Superkritická fluidní chromatografie také vyžaduje vyšší pořizovací a provozní náklady než kapilární elektroforéza.