

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Praha 2009

Bc. Monika Pospíšilová

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Chirální separace enantiomerů dansylovaných aminokyselin a herbicidů na stacionární fázi odvozené od peptidových námelových alkaloidů

Diplomová práce

Chemie životního prostředí

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miroslav Flieger, CSc.

Školitel - garant: Doc.RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Školitel - konzultant: RNDr. Jana Olšovská, PhD.

Praha 2009

Bc. Monika Pospíšilová

Klíčová slova: chirální separace, chirální selektor na bázi námelových alkaloidů,
HPLC-UV

Předmětová hesla: dansylované aminokyseliny, herbicidy, allyl-ergotamin, enantioseparace

Tato diplomová práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. pod vedením RNDr. Miroslava Fliegera, CSc. v letech 2008 až 2009. Poděkování za odborné vedení a pomoc při zpracování tedy patří především mým školitelům RNDr. Miroslavu Fliegrovi, CSc a RNDr. Janě Olšovské, PhD. Dále děkuji Mgr. Tereze Tylové za uvedení do problematiky a cenné rady. V neposlední řadě děkuji své rodině a Mgr. Tomáši Koubovi za veškerou pomoc a podporu v průběhu studia.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Miroslava Fliegera, CSc. a RNDr. Jany Olšovské, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Praha, 29.4.2009

Monika Pospíšilová

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	6
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Definice optické izomerie a nomenklatura	9
2.1.1 Enantiomery a racemická směs	9
2.1.2 Diastereoizomery	9
2.1.3 Nomenklatura	10
2.2 Separace enantiomerů	11
2.2.1 Separační metody	11
2.2.2 Princip chirálního rozpoznávání	12
2.3 Chirální stacionární fáze používané v HPLC	13
2.4 Chirální stacionární fáze na bázi námelových alkaloidů	14
2.4.1 Námelové alkaloidy – výskyt, použití, struktura	14
2.4.2 1-allyl-ergotamin	15
2.5 Příprava chirální stacionární fáze	16
2.5.1 Příprava chirálního selektoru	16
2.5.2 Modifikace silikagelu	16
2.5.3 Navázání selektoru na modifikovaný silikagel	16
2.6 Analyzované látky	18
2.6.1 Aminokyseliny	18
2.6.2 Enantioseparace aminokyselin	20
2.6.2.1 Derivatizace aminokyselin	20
2.6.3 Herbicidy	21
2.6.4 Enantioseparace herbicidů	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Použité chemikálie	24
3.1.1 Rozpouštědla a pufrы	24
3.1.2 Standardy	24
3.2 Přístrojové vybavení	24
3.3 Podmínky měření	25
3.4 Parametry charakterizující chromatografický proces	25

3.4.1	Kapacitní (retenční) faktor	25
3.4.2	SeparáčnÍ faktor	26
3.4.3	Rozlišení	26
3.4.4	Účinnost kolony	26
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	27
4.1	Optimalizace podmÍnek pro dělení Dns-AK	27
4.1.1	Vliv pH	27
4.1.2	Vliv obsahu organického modifikátoru	31
4.1.3	Vliv koncentrace pufru	35
4.2	Optimalizace podmÍnek pro dělení herbicidů	38
4.2.1	Vliv pH	38
4.2.2	Vliv obsahu organického modifikátoru	42
4.2.3	Vliv koncentrace pufru	46
5	ZÁVĚR	53
6	SEZNAM LITERATURY	54

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACN	acetonitril
AGP	α_1 - karboxyprotein
AK	aminokyseliny
Ala	alanin
α	separační faktor (enantioselektivita)
APPA	substituované halogeny kyseliny 2-aryloxyfenoxypropionové
BSA	hovězí sérový albumin
c (mM)	koncentrace v mM
CD	cyklodextrin
CEA	klavinové námelové alkaloidy
CIP	Cahn-Ingold-Prelog
Cl-APA	deriváty kyseliny chlorofenoxypionové
CSP	chirální stacionární fáze
Dns	dansyl
Dns-AK	dansylované aminokyseliny
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	lidský sérový albumin
I.D.	vnitřní průměr kolony z angl. „internal diameter“
k	retenční faktor
k_D	retenční faktor D enantiomerů
k_L	retenční faktor L enantiomerů
k_R	retenční faktor R enantiomerů
k_S	retenční faktor S enantiomerů
LEA	laktamové námelové alkaloidy
Leu	leucin
MA	makrocyclická antibiotika
MeOH	methanol
Met	methionin
N	účinnost kolony, vyjádřená jako počet teoretických pater

N_D	počet teoretických pater kolony pro separaci D enantiomerů
N_R	počet teoretických pater kolony pro separaci R enantiomerů
OPA	o-ftaldialdehyd
pKa	disociační konstanta kyseliny
Phe	fenyl
pI	izoelektrický bod
Pro	prolin
R	rozlišení
Ser	serin
t_D	retenční čas D - enantiomeru
t_L	retenční čas L - enantiomeru
TLC	tenkovrstevná chromatografie
t_m	mrtvý čas kolony
t_r	retenční čas
t_R	retenční čas R - enantiomeru
t_S	retenční čas S - enantiomeru
UV	ultrafialové záření
Val	valin
v/v	poměr objemů složek mobilní fáze
w	šířka píku při základně

1 ÚVOD

Významná část přírodních i uměle připravených sloučenin je chirální, a tedy opticky aktivní. Enantiomery mohou mít díky svému rozdílnému prostorovému uspořádání odlišnou biologickou aktivitu a fyziologické vlastnosti. Optická čistota látek je významná zejména v oblasti produkce léků a pesticidů. Enantiomery se totiž v chirálním prostředí velmi výrazně liší ve svých účincích. Proto je nutno věnovat enantiomernímu zastoupení patřičnou pozornost, neboť vlivem rozdílných interakcí chirálních látek může mít jeden z enantiomerů požadovaný účinek, zatímco druhý izomer je neúčinný nebo dokonce vysoce toxický [1]. Proto jsou chirální separace biologicky aktivních látek, zejména léčiv a agrochemikálií v posledních desetiletích středem zájmu mnoha výzkumných pracovišť. Obecně je u látek užívaných ve farmakologii, toxikologii a v klinických studiích vyžadována maximální optická čistota preparátů [2].

Cílem této diplomové práce je optimalizace metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která by umožnila rozdělit enantiomery dansylovaných aminokyselin a herbicidů na stacionární fázi odvozené od peptidových námelových alkaloidů.

Aminokyseliny, jedny z nejdůležitějších biomolekul, existují jako stereoizomery a mají nejméně jedno asymetrické centrum (výjimkou je glycin). V živých organismech se vyskytují ve velkém množství a účastní se zde mnoha biologických procesů. Aminokyseliny jsou součástí proteinů a peptidů, tedy strukturních bílkovin, enzymů i mnoha hormonů.

Pesticidy jsou chemické přípravky používané zejména v zemědělství. Bez ochranných účinků pesticidů způsobují škůdci a choroby rostlin významné ztráty na úrodě všech zemědělských plodin. Hromadné používání pesticidů v zemědělství mělo v minulých letech velmi nepříznivý dopad na životní prostředí a lidské zdraví. V současnosti narůstá snaha minimalizovat používání pesticidů v zemědělské výrobě a vzrůstá důležitost analýzy těchto látek v půdě, vodě a vzduchu. Přísná měřítka se kladou především na zdravotní nezávadnost pesticidů na lidský organismus [3]. V roce 1995 bylo uvedeno, že přibližně 25 % používaných pesticidů má chirální strukturu [4]. Přesto je mnoho těchto agrochemikálií dodáváno na trh jako racemické směsi a to především vzhledem k nákladnosti jejich separace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice optické izomerie a nomenklatura

2.1.1 Enantiomery a racemická směs

Enantiomery jsou prostorové izomery, které mají stejnou chemickou strukturu, ale je mezi nimi vztah jako mezi předmětem a jeho zrcadlovým obrazem. Tyto molekuly mají v achirálním prostředí stejné fyzikální a chemické vlastnosti (teplotu tání, teplotu varu, rozpustnost, reaktivitu), liší se pouze odlišnou prostorovou konfigurací [5, 6]. Enantiomery se liší pouze v chirálním prostředí.

Enantiomery jsou opticky aktivní látky a mají schopnost otáčet rovinu polarizovaného světla. Enantiomery otáčejí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném směru. Naměřený úhel závisí na podmínkách měření (koncentraci vzorku, délce kyvety, vlnové délce použitého světla, použitím rozpouštědla a teplotě) [7].

Opticky aktivní látky jsou asymetrické. Takové látky nemají v žádné své konformaci prvek symetrie (střed, osu ani rovinu souměrnosti) a nazývají se chirální [8]. Nejjednodušším zdrojem chiralitity organické molekuly je uhlíkový atom, na němž jsou vázány čtyři odlišné atomy nebo substituenty [9].

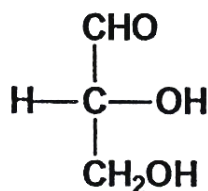
Směs složená ze dvou enantiomerů o stejné koncentraci, bez ohledu na jejich skupenství, se nazývá racemická směs neboli racemát [8]. Protože enantiomery mají stejnou absolutní hodnotu optické otáčivosti, ale liší se smyslem otáčení, příspěvky obou forem se v racemické směsi vzájemně ruší, a proto má racemát nulovou hodnotu optické rotace [1]. Racemizace se nazývá proces přeměny konformace na všech asymetrických centrech dané molekuly (látky), při kterém nevratně vzniká z výchozí neracemické chirální sloučeniny racemát [10].

2.1.2 Diastereoizomery

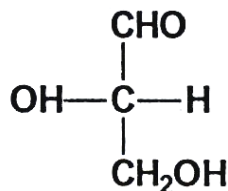
Kromě enantiomerů, které mají jedno chirální centrum, existuje řada sloučenin, obsahující ve svých molekulách větší množství chirálních center. Diastereoizomery jsou stereoizomery, jež nejsou svými zrcadlovými obrazy, vznikají jen u látek se dvěma a více asymetrickými centry. Mají odlišné fyzikální a chemické vlastnosti, což je způsobeno různými intramolekulárními vzdálenostmi mezi jednotlivými skupinami [11].

2.1.3 Nomenklatura

U sacharidů, aminokyselin a peptidů se k rozlišení absolutní konfigurace na asymetrickém uhlíku používá označení D- (dexter) a L- (leavus). Toto označení udává směr stáčení roviny plošně polarizovaného světla vpravo resp. vlevo. D a L konfigurace chirálního atomu vychází z Fisherovi projekce vzorců. Fisher přiřadil (+)-izomeru označení D a (-)-izomeru označení L (obrázek 1). Toto označení však nemá nic společného se směrem stáčení roviny plošně polarizovaného světla. U ostatních enantiomerů se absolutní konfigurace vyjadřuje pomocí konvence podle autorů Cahna, Ingolda, a Preloga (CIP systém), která používá označení R- a S-. Toto označení je použitelné pro každou chirální molekulu a umožňuje určení absolutní konfigurace přímo z R nebo S označení. Pokud molekula obsahuje více stereogenních center, CIP systém se aplikuje na každé toto centrum chiralilty a konfigurace molekuly se vyjadřuje souborem R a S afixů. Značení R a S asymetrického centra sloučeniny je formální a nesouvisí se skutečným směrem otáčení plošně polarizovaného světla [8].



D-(+)- glyceraldehyd



L-(-) - glyceraldehyd

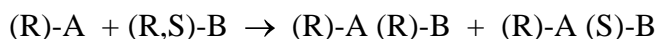
Obr. 1: Fisherova projekce molekuly glyceraldehydu.

2.2 Separace enantiomerů

2.2.1 Separační metody

Pro separaci enantiomerů byla vyvinuta řada chromatografických, elektroforetických, spektroskopických a membránových technik. Pro rychlost, účinnost a reprodukovatelnost jsou z výše jmenovaných metod nejčastěji používané chromatografické techniky, z nichž nejběžnější je vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Mezi další chromatografické techniky, které byly použity pro separaci enantiomerů, patří tenkovrstevná chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), superkritická fluidní chromatografie nebo kapilární elektroforéza (CE) [12]. Při separaci enantiomerů jsou využívány dva základní postupy: přímé a nepřímé separační metody [13].

Nepřímé separační metody jsou založeny na derivatizační reakci racemického analytu (R,S)-B s opticky čistým činidlem (R)-A :



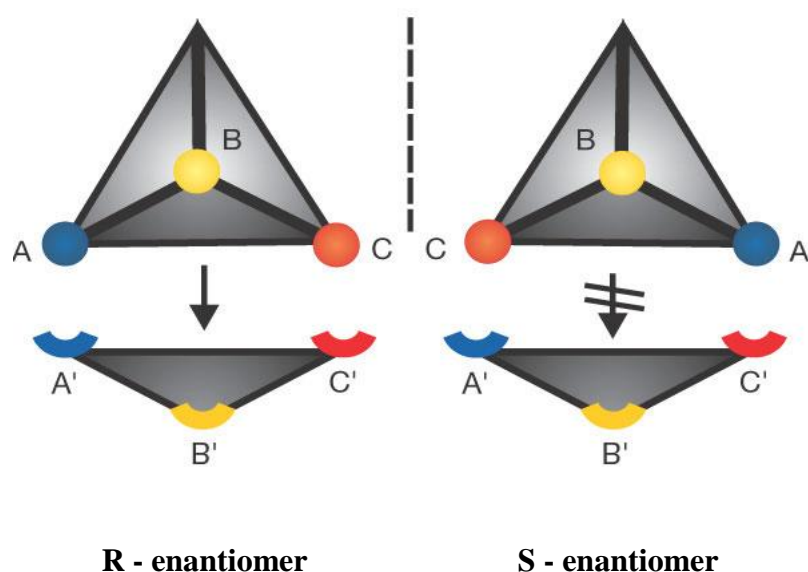
Při této reakci vzniká pár diastereomerních sloučenin, které mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti. K následné separaci pak může být použit achirální chromatografický systém [13].

Nevýhodou této metody je podmínka vysoké optické čistoty derivatizačního činidla. Tento způsob je rovněž nevýhodný pro preparativní účely, kde je potřebná následná izolace čistého enantiomeru ze stabilního diastereoizomeru.

Při přímém dělení probíhá separace enantiomerů v chirálním prostředí za tvorby přechodných diastereoizomerních komplexů. Tyto komplexy se vytváří mezi chirálním selektorem a dělenými enantiomery přímo v separačním systému. Mají rozdílnou konstantu stability, což vede k rozdílné retenci obou enantiomerů. Chirálním selektorem (CS) často bývá chirální stacionární fáze (CSP), méně často se chirální selektor přidává do mobilní fáze [14]. Výhodou metody je reverzibilita děje, solut není po analýze změněn. V případě přidávání chirálního selektoru do mobilní fáze je ovšem nutné oddělit chirální selektor od požadovaného enantiomeru.

2.2.2 Princip chirálního rozpoznávání

V achirálním prostředí mají chirální látky shodné vlastnosti a za těchto podmínek tedy nemohou být rozděleny. Techniky separace enantiomerů jsou založeny na principech chirálního rozpoznávání pozorovaného v přírodě – enantiomery je možné rozdělit pouze v chirálním prostředí [5]. Pro rozdělení enantiomerů je potřeba vytvořit prostředí, které dovede analyty stereoselektivně rozpoznat [15]. Mechanismus chirálního rozpoznávání je založen na minimálním požadavku třibodové interakce (Dalglish, 1952), (obrázek 2) [16]. Pro enantioselektivní rozpoznávání je třeba, aby analyt (substrát, enantiomer) současně interagoval třemi různými interakcemi s chirálním selektorem a alespoň jedna interakce musí mít stereoselektivní charakter. Má-li dojít k rozlišení enantiomerů, pak každý z nich musí interagovat s chirálním selektorem různě silně. V závislosti na použité mobilní fázi a chirálním selektoru se na interakcích mohou podílet π - π interakce, elektrostatické interakce, vodíková vazba, sterické stínění, iontové a dipólové interakce, hydrofilní interakce, van der Waalovy síly a inkluze [15].



Obr. 2: Enantioselektivní rozpoznávání – model třibodové interakce.

2.3 Chirální stacionární fáze používané v HPLC

Chirální stacionární fáze používané v kapalinové chromatografii jsou nejčastěji tvořeny silikagelovým nosičem s navázanými chirálními selektory přírodního původu nebo synteticky připravenými. Mezi nejčastěji používané chirální selektory patří především makrocyclická antibiotika [17], cyklodextriny [18] a proteiny [19], které jsou schopny separovat celou řadu strukturně odlišných látek.

Makrocyclická antibiotika (MA), především glykopeptidy, mezi něž se řadí teikoplanin, vankomycin, ristocetin A a avoparcin, tvoří významnou skupinu látek chirálních selektorů, které našly velké uplatnění pro výrobu CSP s širokými aplikačními možnostmi [20]. Jejich struktura je velmi složitá a obsahují velké množství chirálních center a vázaných funkčních skupin, které umožňují řadu interakcí s chirálními analyty. CSP na bázi glykopeptidů lze použít jak v normálním pracovním módu, tak v reverzním, ale i polárně organickém [14, 17].

Cyklodextriny (CD) a jejich deriváty jsou cyklické oligosacharidy tvořené různým počtem glukopyranosových jednotek. Jsou schopné vytvářet inkluzní komplexy [18]. Popularita cyklodextrinových chemicky vázaných CSP je dána jejich schopností dělit strukturně velmi rozmanité enantiomerní páry a možností použití různých mobilních fází – separačních módů bez nebezpečí ztráty jejich separační účinnosti [21]. Cyklodextriny mohou být použity i jako chirální aditiva do mobilní fáze nebo jako CSP navázané na vhodném pevném nosiči. Jako aditiva jsou výhodná pro svou dostupnost v opticky čisté formě. Nemohou však být použity ve vysokých koncentracích pro svou nízkou rozpustnost [14].

Další skupinou CSP jsou stacionární fáze na bázi proteinů. Proteiny jsou vysokomolekulární polymery obsahující mnoho interakčních center. Nejvíce používanými proteinovými selektory jsou lidský α_1 -karboxyprotein (AGP), lidský (HSA), nebo hovězí (BSA) sérový albumin [19]. Na enantioselektivních interakcích se zde podílejí především interakce hydrofobní, elektrostatické síly a vodíkové vazby.

Pirklovy fáze [22], jsou π -komplexotvorné stacionární fáze, které vytvářejí se solutem diastereomerní komplexy převážně π - π interakcemi a vodíkovou vazbou [23]. Podmínkou pro úspěšné dělení je komplementarita π -donorové a π -akceptorové skupiny fáze a analytu. Nejpoužívanějšími π akceptorové CSP obsahují 3,5-dinitrobenzoylované α -aminoskupiny obsahující elektronově deficitní aromatický kruh a dusík schopný vytvářet vodíkovou vazbu. V současné době jsou dostupné fáze obsahující jak π -akceptorovou, tak π -donorovou skupinu.

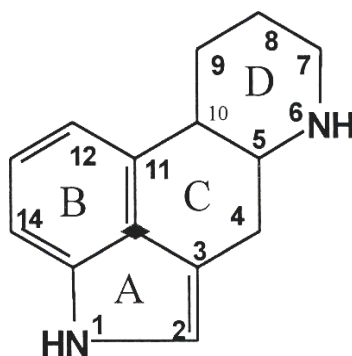
2.4 Chirální stacionární fáze na bázi námelových alkaloidů

2.4.1 Námelové alkaloidy – výskyt, použití, struktura

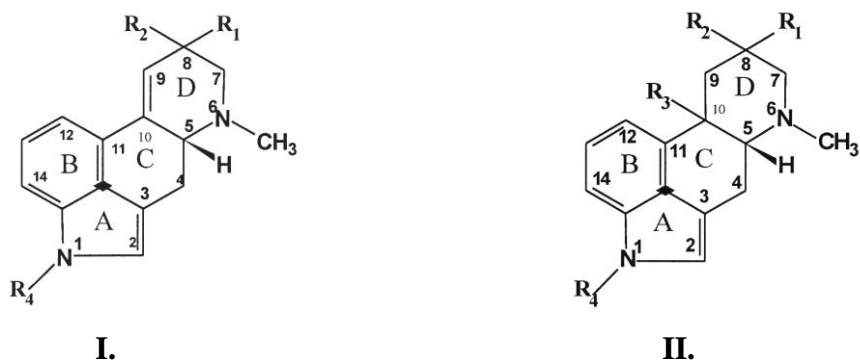
Malé molekuly přírodních látek mohou být atraktivním zdrojem chirálních selektorů pro vývoj vysoce účinných a selektivních CSP. Jednu z takových skupin látek tvoří námelové alkaloidy, které jsou dostupné jako čisté enantiomery s nízkými náklady na přípravu [24]. Námelové alkaloidy tvoří velkou skupinu farmakologicky významných látek. Jsou produkovány houbami rodu *Claviceps* jako sekundární metabolity. Námelové alkaloidy se hojně používají k léčbě mnoha nemocí, např. hypertenze, migrény, trombózy, pásového oparu, Parkinsonovy choroby, revmatických a dalších onemocnění [25].

Přírodní námelové alkaloidy jsou deriváty ergolinu, patřící mezi heterocyklické alkaloidy obsahující ve své struktuře tetracyklický systém, kterému Jacobs a Gould dali název ergolin (obrázek 3), [26]. Semisyntetické námelové alkaloidy s nasyceným D kruhem obsahují tři asymetrické uhlíky C5, C8 a C10 na rozdíl od přírodních námelových alkaloidů, které obsahují jen dva asymetrické uhlíky C5 a C8 (obrázek 4, str. 15), [27]. V závislosti na typu R substituentů v pozici na C8 v ergolinovém kruhu, dělíme námelové alkaloidy do čtyř skupin: klavinové alkaloidy a 6,7-sekoergoliny, deriváty kyseliny lysergové, peptidové alkaloidy (CEA) a laktamové alkaloidy (LEA) [28].

První čistý námelový alkaloid izoloval a identifikoval Stoll v roce 1952 [29]. Námelový alkaloid, semisyntetický derivát allyl-tergurid jako CSP, byl např. využit k enantioseparaci dansylovaných aminokyselin [30], herbicidů [31] a dalších látek, např. profenů [32].



Obr. 3: Ergolinový skelet.

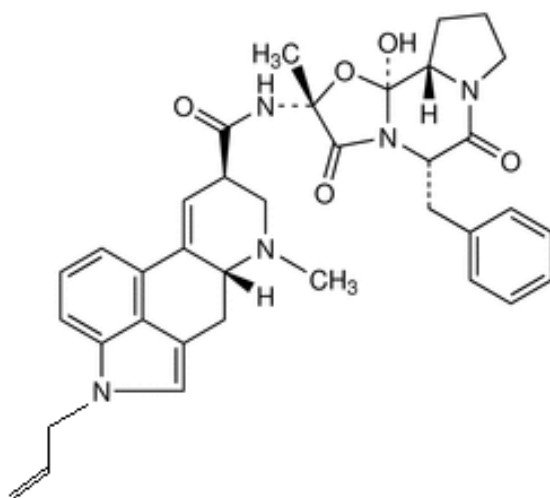


Obr. 4: Chemické struktury: I. – přírodních, II. – syntetických námelových alkaloidů.

2.4.2 Chirální separace na 1-allyl-ergotaminu

Chirální selektor 1-allyl-ergotamin je zcela nový selektor, na kterém dosud nebyly žádné chirální separace provedeny. Tato CSP se komerčně nevyrábí. Myšlenka potencionálního rozpoznávání na tomto chirálním selektoru se opírá o selektory, které už byly pro chirální separace použity (1-allyl-tergurid, aminopropyl-tergurid, aminobutyl-tergurid) [25, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35].

Ergotamin je přírodní peptidový námelový alkaloid, který je strukturně odvozený od ergolinového kruhu. Na něm je v pozici C8 navázaný cyklický peptid, tvořený třemi aminokyselinami (Ala, Phe, Pro). 1-allyl-ergotamin je látka semisyntetická, jejíž molekula má 6 chirálních center a to na uhlících C5, C8, C2', C5', C11', C12'. Pro chirální separace byl použit diastereoizomer 1-allyl-ergotaminu o konfiguraci (5R, 8R, 2'R, 5'S, 11'S, 12'R), (obrázek 5).



Obr. 5: 1-allyl-ergotamin.

2.5 Příprava chirální stacionární fáze

2.5.1 Příprava chirálního selektoru

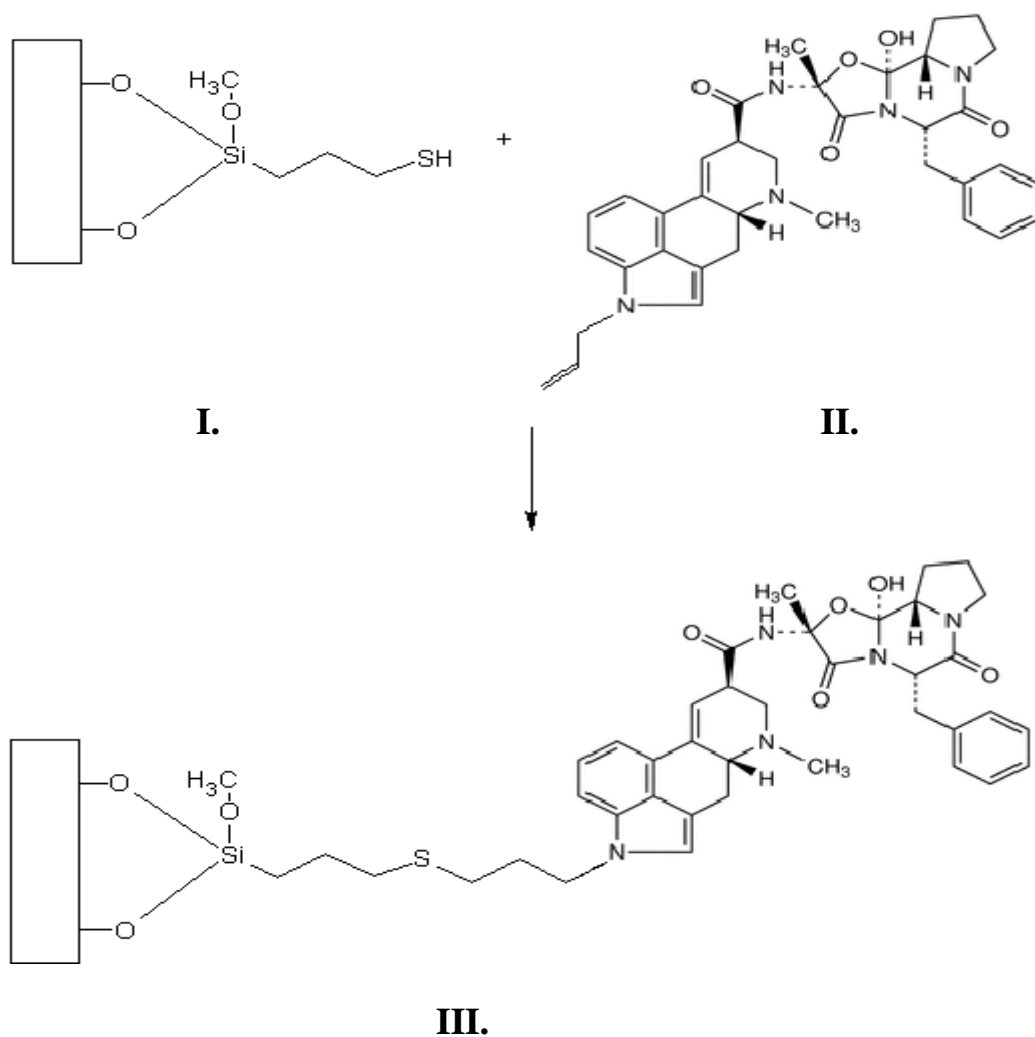
Tetramethylamoniumhydroxid (20 %, 8 ml) a NaOH (50 %, 24 ml) byly přidány k 160 ml CH₂Cl₂ obsahující (5R, 8R, 2'R, 5'S, 11'S, 12'R)-ergotamin (4 g, 11,7mM). Allylbromid (5 ml, 58,6 mM) byl přidán po kapkách, za rychlého míchání po dobu 5 min a při 30 °C. Organická vrstva byla oddělena, promyta vodou (2 x 200 ml) a koncentrována odpařením za sníženého tlaku. Odparek byl chromatografován na silikagelovém sloupci (40 g) s CH₂Cl₂ jako mobilní fází. Frakce obsahující allyl-ergotamin byly odpařeny a čistá látka byla krystalována z roztoku diethylether-petroletheru. Tímto postupem bylo získáno 2,5 g 1-allyl-ergotaminu. Struktura byla ověřena pomocí EI-MS spektroskopie.

2.5.2 Modifikace silikagelu

Merktaptopropyltrimethoxysilan (5 ml) byl smíchán s vysušeným silikagelem (5 g). Směs byla rozpuštěna v 150 ml bezvodého toluenu a za stálého míchání zahřívána po dobu 12-ti hodin při 100 °C pod ochranou dusíkovou atmosférou. Získaný modifikovaný silikagel byl filtrován a promyt toluenem, n-hexanem, 2-propanolem, diethyletherem.

2.5.3 Navázání selektoru na modifikovaný silikagel

K pěti gramům modifikovaného silikagelu (I.) rozpuštěnému v 50 ml chloroformu bylo přidáno 0,5 g (0,102 mmol) 1-allyl-ergotaminu (II.) a α,α' -azobis(izobutyronitrilu) (22 mg). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na 60 °C 15 hodin, poté filtrována, postupně promyta chloroformem, methanolem, acetonem, 2-propanolem a diethyletherem a finálně sušena ve vakuu při 50 °C. Získaná chirální stacionární fáze (III.) byla suspendována v methanolu (3 g na 20 ml) a plněna pod tlakem 40 MPa do nerezové kolony. Schéma navázání chirálního selektoru na modifikovaný silikagel je znázorněno na obrázku 6 str. 17.



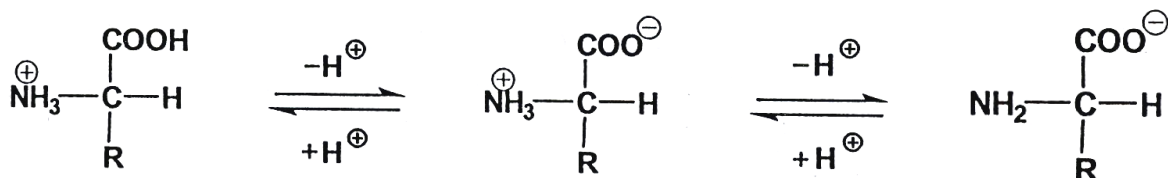
Obr. 6: Schematické znázornění syntézy chirální stacionární fáze: I. modifikovaný silikagel, II. 1-allyl-ergotamin, III. získaná chirální stacionární fáze.

2.6 Analyzované látky

2.6.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny (AK) jsou organické látky, které obsahují jeden asymetrický uhlík (kromě glycinu), a proto mohou existovat ve dvou optických formách (D a L). Obecně se předpokládalo, že se všechny aminokyseliny v živých organismech, s výjimkou bakterií, vyskytují výhradně v L-formě. Později byl v nervové tkáni oka měkkýšů a korýšů ve významném množství nalezen také D-alanin [36]. Snyder a kolektiv zjistili u savců přítomnost kyseliny D-asparagové, konkrétně ve vnější plexiformní vrstvě a v určitých jádrech mozkového kmene [37]. Nedávno byl také prokázán volný D-alanin a volná kyselina D-asparagová v lidském mozku a to jak v jeho bílé, tak i šedé hmotě.

Všechny aminokyseliny mají ve své struktuře karboxylovou skupinu a aminoskupinu. Vedle těchto základních funkčních skupin má každá aminokyselina postraní alifatický nebo aromatický řetězec, který může být dále substituován dalšími funkčními skupinami (např. -OH, -SH, -NH₂), [38]. Iontový charakter aminokyselin je závislý na pH (obrázek 7).

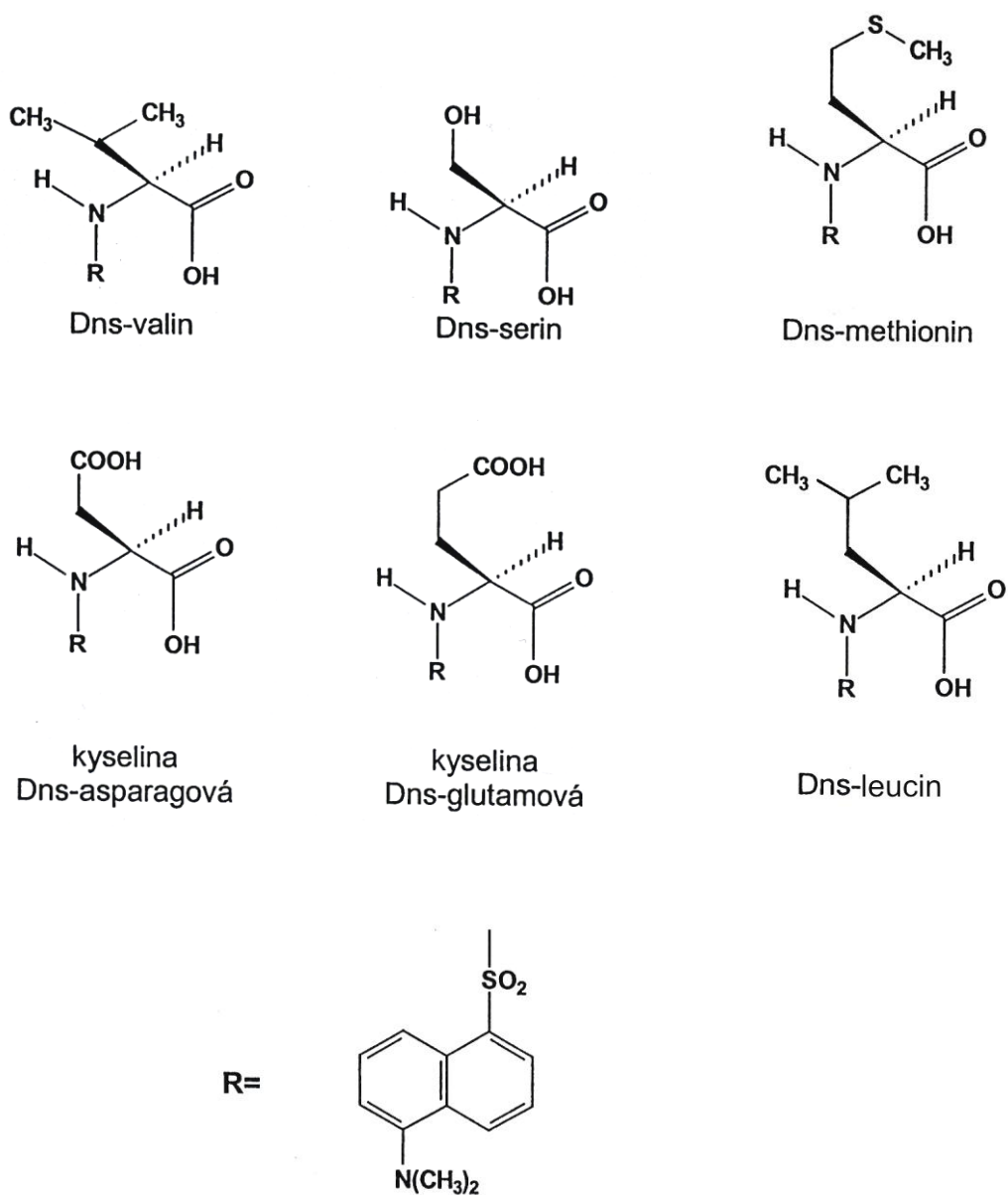


Obr. 7: Chemická struktura iontových forem aminokyselin.

Karboxylová skupina je schopna odštěpovat proton H⁺, bazická aminoskupina je schopna ionty H⁺ přijímat za vzniku amoniových solí. Jsou-li disociovány obě skupiny, vznikají obojetné ionty. Rovnováha mezi jednotlivými formami závisí na disociačních konstantách karboxylové a aminoskupiny. Při určité hodnotě pH velmi výrazně převládá obojetná forma aminokyseliny. Tato hodnota je označována jako izoelektrický bod (pI), který můžeme vypočítat z hodnot pK_a kyselé a bazické skupiny [39].

$$pI = \frac{pK_a(1) + pK_a(2)}{2}$$

Chirální separace byly v této práci studovány na D a L derivátech dansylovaných aminokyselin (Dns-AK) (obrázek 8).



Obr. 8 : Chemické struktury studovaných dansylovaných aminokyselin.

2.6.2 Enantioseparace aminokyselin

Enantioseparace aminokyselin mají velký význam v mnoha odvětvích, např. v biomedicíně a v potravinářském průmyslu. K objasnění struktury mnoha mikrobiálních produktů jako např. polypeptidových antibiotik, některých cyklických peptidů, kde se vyskytují jak L-formy, tak i D-formy aminokyseliny, jsou enantioseparační metody nezbytné [10]. V současné době je známo mnoho technik pro dělení volných i derivatizovaných aminokyselin, ale přesto jsou vítány nové postupy, které dosahují vyšší enantioselektivity, nižší ceny analýz a větší reprodukovatelnosti.

Mnoho metod bylo vyvinuto jak pro dělení nederivatizovaných, tak i derivatizovaných aminokyselin. Zpočátku byly aminokyseliny separovány na CSP s navázaným L-prolinem a přídavkem mědi do mobilní fáze [40]. Optické antipody dansylovaných aminokyselin byly separovány na reverzní fázi s mobilní fází obsahující chirální komplexy mědi. Velkou nevýhodou těchto metod je mobilní fáze obsahující měď, která způsobuje vyšší absorpční pozadí při použití UV detekce. Pro dělení enantiomerů aminokyselin je dnes využíváno chirálních stacionárních fází na bázi přírodních materiálů (celulózy) [41], hovězího sérového albuminu [19, 42] a glykopeptidových antibiotik. Dalšími používanými chirálními selektory pro dělení aminokyselin a jejich derivátů jsou crown-ethery a cyklodextriny [21, 43].

2.6.2.1 Derivatizace aminokyselin

Derivatizace je převedení analyzované látky na derivát, který má výhodnější chromatografické a nebo spektrální vlastnosti než měla původní forma analyzované látky. Derivatizací se často také zvýší tepelná stabilita látek, detekční limit a účinnost separace. Při derivatizaci je důležité, aby reakce probíhala rychle, kvantitativně, selektivně a deriváty by měly být dostatečně stabilní. Nejčastěji derivatizované funkční skupiny jsou hydroxy-, amino- a karboxylová skupina [44]. Nejpoužívanějšími derivatizačními činidly používanými v HPLC jsou o-ftaldialdehyd (OPA), nebo dansylchlorid (Dns).

2.6.3 Herbicidy

Podle účelu použití rozdělujeme pesticidy do několika skupin, z nichž jsou nejdůležitější insekticidy (prostředky na hubení hmyzu), fungicidy (prostředky proti houbovým chorobám a plísním) a herbicidy (prostředky proti plevelům). Podle účinku rozeznáváme herbicidy totální, které hubí všechny rostliny a herbicidy selektivní, hubící jen určité plevele, ale na vlastní kulturní rostliny škodlivě nepůsobí.

Sérií biologických testů byla prokázána závislost účinku herbicidů na typu použitého stereoisomeru. V určitých případech má pouze jeden izomer herbicidní aktivitu, zatímco druhý nemá toxický efekt pouze k plevelům, ale také k vlastním kulturním rostlinám [45].

Chirální herbicidy se dělí na deriváty kyseliny chlorofenoxypropionové (Cl-APA), substituované halogeny kyseliny 2-aryloxyfenoxypropionové (APPA) a kyselinu N-benzoyl-N-(3-chloro-4-fluorofenyl)aminopropionovou (*Flamprop*). (R)-(-)-izomery Cl-APA a APPA a (R)-(+)-izomer flampropu se projevují silnějšími herbicidními účinky, ale jejich optické antipody jsou toxické [46].

Do skupiny 2-aryloxyfenoxypropionové kyseliny (APPA) řadíme:

Fluazifop (kyselina 2-(4-{[5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]oxy}-fenoxy) propionová),

Diclofop (kyselina 2-[4-(2,4-dichlorofenoxy)-fenoxy propionová),

Haloxyfop (kyselina 2-(4-{[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl]oxy}-fenoxy) propionová),

Fenoxaprop (kyselina 2-[4-(6-chloro-2-benzoxazolyl)oxy]-fenoxy propionová).

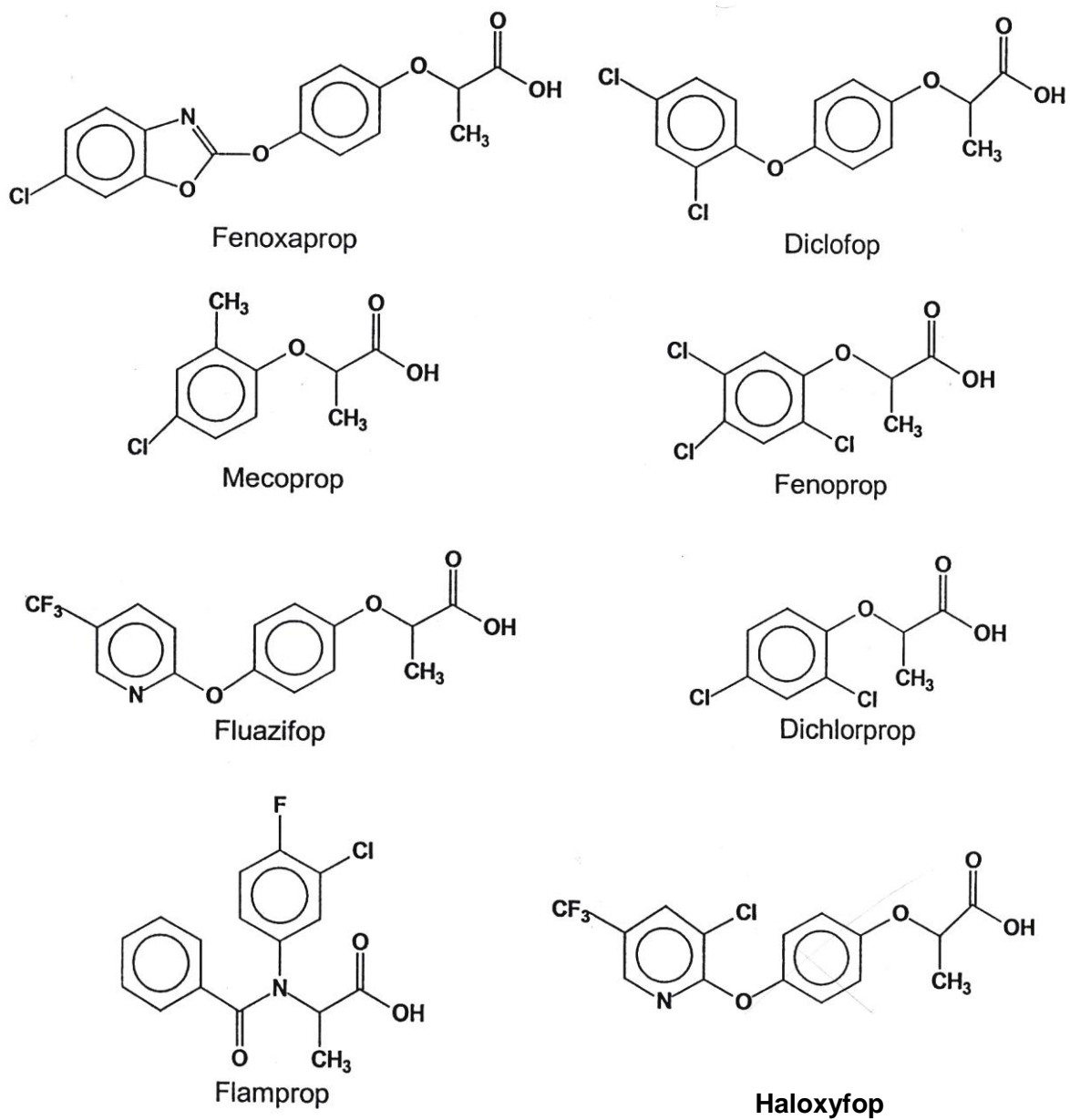
Do skupiny kyselin chlorofenoxypropionových (Cl-APA) řadíme:

Mecoprop (kyselina 2-(4-chloro-2-methylfenoxy) propionová),

Dichloroprop (kyselina 2-(2,4-dichlorofenoxy) propionová),

Fenoprop (kyselina 2-(2,4,5-trichlorofenoxy) propionová).

Chirální separace byly studovány na R a S derivátech herbicidů, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku 9 str. 22.



Obr. 9: Chemické struktury studovaných herbicidů.

2.6.4 Enantioseparace herbicidů

Analytické metody doposud užívané pro separaci enantiomerních sloučenin herbicidů zahrnují plynovou chromatografii [47], tenkovrtevnou chromatografii [48], vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii [31, 49] a kapilární elektroforézu [33, 50]. Nejpoužívanější analytickou metodou pro přímé chirální separace herbicidů se v posledních letech stává kapilární elektroforéza. V tomto případě je chirální selektor přidáván k základnímu elektrolytu [51].

Metodou kapilární elektroforézy bylo k enantioseparaci volných kyselin herbicidů využito jako chirálních selektorů např. vankomycinu [52], cyklodextrinu [53] a semisyntetického derivátu na bázi terguridu [33]. Ten byl také použit pro enantioseparaci herbicidů v práci [33] (konkrétně 1-allyl (5R,8S,10R)-tergurid).

Padiglioni a kolektiv popsali enantiomerní separaci halogenů 2-aryloxypropionové kyseliny na terguridové chirální stacionární fázi, metodou vysokoúčinná kapalinové chromatografie [31].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Rozpouštědla a pufr

K analýzám byly jako rozpouštědla použity acetonitril (ACN) a methanol (MeOH) v čistotě Gradient Grade (Chromservis, Praha, ČR).

Acetátový pufr byl připravován z kyseliny octové a hydroxidu amonného, fosfátový pufr z kyseliny trihydrogenfosforečné a hydroxidu draselného (vše Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pro dokonalé smíchání a odplynění mobilní fáze byla směs filtrována za sníženého tlaku.

Redestilovaná voda (H₂O) byla filtrována Milli-Q filtrovacím systémem (Millipore, Milford, MA, USA).

3.1.2 Standardy

Standardy dansylovaných aminokyselin byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Herbicidy poskytl Istituto di Chromatografia (CNR, Řím, Itálie).

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml methanolu.

3.2 Přístrojové vybavení

Separace enantiomerů byla prováděna na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu vybaveném pumpou WatersTM 600 Controller, fluorescenčním detektorem Waters 2475 a UV detektorem WatersTM 486 a autosamplerem Waters 717. Data byla vyhodnocena programem Millennium³² verze 4,0 (Waters, Milford, USA).

Hodnoty pH byly měřeny na pH-metru 538 MultiCal, který byl kalibrován standardy téhož výrobce (WTW, Německo).

Vzorky a chemikálie byly váženy na analytických vahách AE 163 Mettler.

Pro odstředění vzorků byla použita centrifuga Mini Spin Eppendorf.

3.3 Podmínky měření

Enantioseparace testovaných látek byly prováděny na chromatografické koloně o rozměrech (150 x 4,6 mm I.D.), naplněné 1-allyl-ergotaminem navázaným na silikagelý nosič, velikost zrn 5 μm , velikost póru 100 Å (Scientific Glass Engineering, Milton Keynes, UK).

Pro separaci Dns-AK byla mobilní fáze tvořena fosfátovým pufrům a acetonitrilem. Pro separaci herbicidů byla složena v první sérii měření z fosfátového pufru a methanolu, v druhé sérii měření z acetátového pufru a acetonitrilu. Postupně bylo podle potřeby měněno pH, obsah organického modifikátoru a koncentrace pufru (uvedeno ve výsledkové části).

Separace byly prováděny v izokratickém módu. Průtoková rychlost mobilní fáze byla pro všechna měření 1 ml/min při teplotě kolony 25 °C. Dns-aminokyseliny i herbicidy byly detekovány při vlnové délce 254 nm. Dávkované množství látky na kolonu bylo vždy 10 μl .

3.4 Parametry charakterizující chromatografický proces

Naměřená data byla vyhodnocena programem Millennium³² verze 4,0. Tímto programem byly u jednotlivých analytů určeny retenční časy, retenční (kapacitní) faktory, separační faktory, rozlišení a účinnost kolony, dále využité pro zpracování výsledků.

3.4.1 Retenční (kapacitní) faktor

Hodnoty kapacitních faktorů byly vypočítány podle vztahu:

$$k = (t_r - t_m) / t_m$$

kde t_r je retenční čas, tedy celkový čas, který analyt setrvá v koloně a t_m je mrtvý objem kolony, tedy retenční čas analytu, který není stacionární fází za těchto podmínek zadržován.

3.4.2 Separační faktor

Chromatografická separace dvou enantiomerů je charakterizována separačním faktorem (enantioselektivitou) α .

$$\alpha = (t_{r2} - t_m) / (t_{r1} - t_m)$$

$$\alpha = k_2 / k_1$$

kde k_1 resp. k_2 jsou retenční faktory dříve resp. později eluující látky.

3.4.3 Rozlišení

Rozlišení je definováno jako míra relativní separace dvou píků v závislosti na účinnosti kolony (určené šířkou píků).

$$R = 2 (t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2)$$

kde t_{r2} resp. t_{r1} jsou retenční časy později resp. dříve eluující složky, w_1 a w_2 jsou šířky píků při základně.

3.4.4 Účinnost kolony

Chromatografická kolona je charakterizovaná účinností (počet teoretických pater), která je mírou schopnosti transportovat látku do nejužší zóny.

$$N = 16 (t_r / w)^2$$

kde t_r je retenční čas a w je šířka píku při základně.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek pro dělení Dns-AK

Podmínky pro enantioseparaci Dns-AK byly vybrány na základě studie vlivu pH, iontové síly pufru a obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi. Vybrané chromatogramy enantioseparace Dns-AK jsou uvedeny na obrázcích 10 – 13 na str. 38, 39.

4.1.1 Vliv pH

U dansylderivátů AK (obrázek 8, str. 19) byla sledována závislost retenčních faktorů, separačního faktoru, rozlišení a účinnosti kolony na pH pufru v oblasti 3,5 až 5,5 (tabulka 1, str. 28).

Retenční faktory všech studovaných Dns-AK klesají se zvyšujícím se pH (graf 1, str. 29). Enantioselektivita a účinnost kolony je konstantní, ale při pH 5,5 prudce klesá u všech studovaných látek kromě Dns-leucinu (graf 2, str. 29 a graf 4, str. 30). Závislost rozlišení na pH pufru je uvedena v grafu 3 na str. 30.

V použitém rozmezí pH (3,5 – 5,5) jsou zkoumané AK ve formě obojetných iontů. Je známo že dansylace navíc ještě více zvyšuje disociační konstantu AK. Dusík obsažený na CSP v poloze N6 je v tomto rozmezí pH také v protonizované formě. Primární vazba z potřebné tříbodové interakce je tedy elektrostatická interakce nabitě karboxylové skupiny AK s protonizovaným dusíkem na CSP. Prudký pokles enantioselektivity mezi pH 5 a 5,5 naznačuje, že tato interakce je enantioselektivní. Vysvětlením poklesu by mohla být částečná ztráta protonizace vazebného dusíku na CSP při přechodu mobilní fáze do vyššího pH.

Dns-deriváty kyseliny asparagové a glutamové se na použité CSP vůbec nedělily.

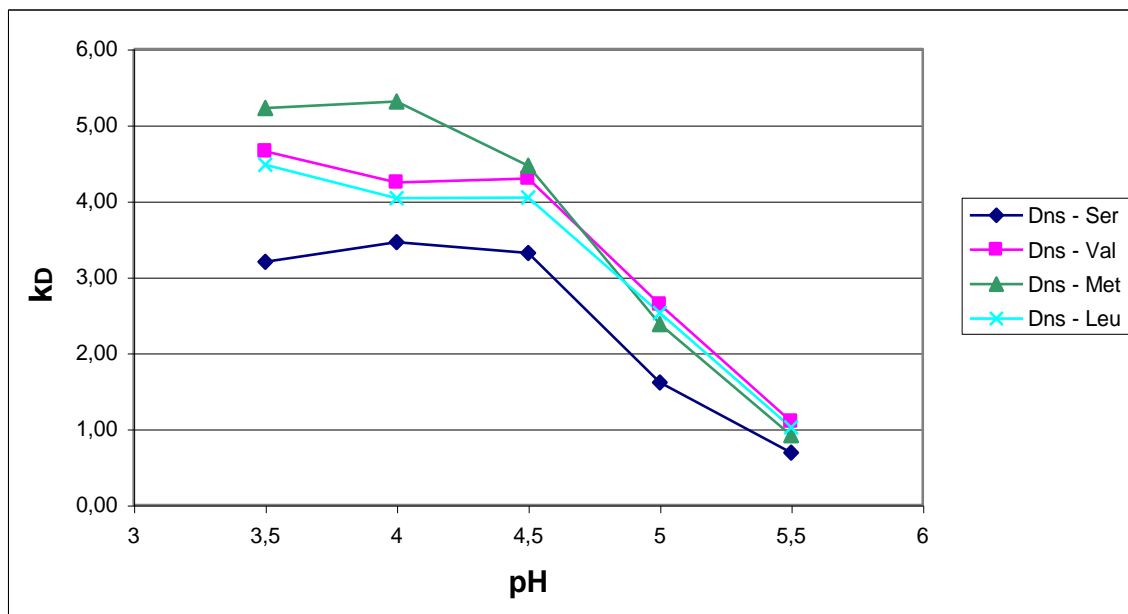
Optimální hodnota pH pro další měření byla vyhodnocena jako 4,0.

Tab. 1: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery dansylovaných aminokyselin jako funkce pH pufru H₃PO₄/KH₂PO₄.

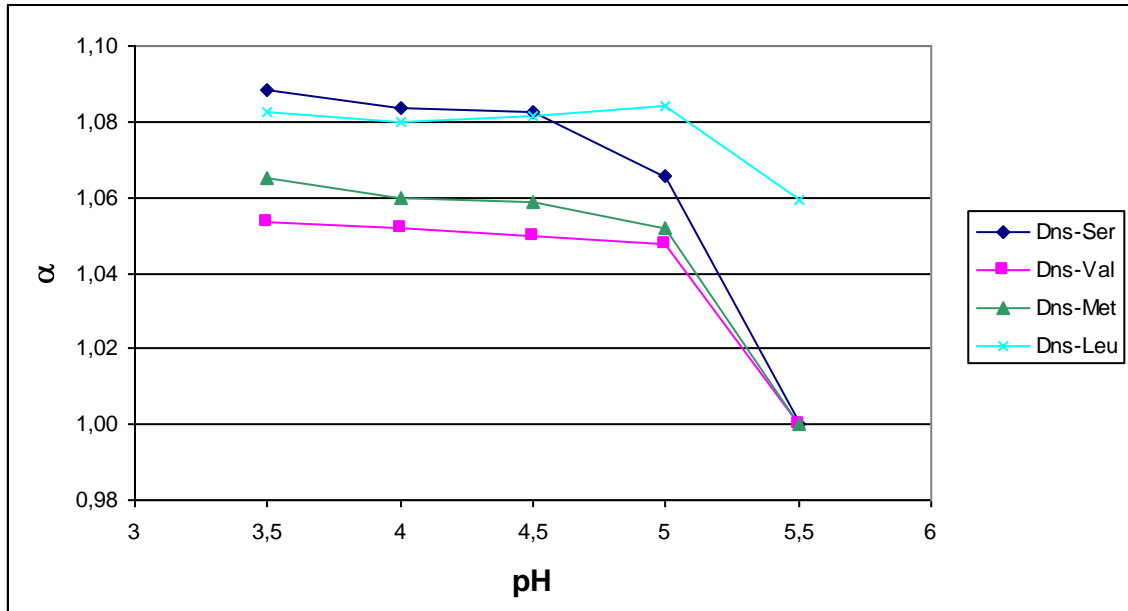
	Dns - AK	t _D	t _L	k _D	k _L	α	R	N _D
pH 3,5	Dns - serin	4,83	5,16	3,20	3,49	1,09	0,93	3743
	Dns - valin	6,50	6,79	4,65	4,90	1,05	0,63	3813
	Dns - asparagová kys.	19,40	---	15,87	---	1,00	---	1049
	Dns - methionin	7,16	7,55	5,22	5,56	1,07	0,86	3493
	Dns - leucin	6,30	6,72	4,48	4,85	1,08	0,81	3169
	Dns - glutamová kys.	11,46	---	8,97	---	1,00	---	418
pH 4,0	Dns - serin	5,13	5,46	3,46	3,75	1,08	0,78	3341
	Dns - valin	6,03	6,23	4,25	4,42	1,04	0,5	3813
	Dns - asparagová kys.	17,14	---	13,90	---	1,00	---	1084
	Dns - methionin	7,26	7,65	5,31	5,66	1,06	0,75	3546
	Dns - leucin	5,80	6,16	4,04	4,35	1,08	0,79	3219
	Dns - glutamová kys.	10,20	---	7,87	---	1,00	---	433
pH 4,5	Dns - serin	4,97	5,28	3,32	3,59	1,08	0,81	3658
	Dns - valin	6,09	6,33	4,29	4,51	1,05	0,63	3910
	Dns - asparagová kys.	16,89	---	13,69	---	1,00	---	1047
	Dns - methionin	6,28	6,59	4,46	4,73	1,06	0,71	3366
	Dns - leucin	5,80	6,18	4,05	4,38	1,08	0,79	3130
	Dns - glutamová kys.	10,10	---	7,79	---	1,00	---	424
pH 5,0	Dns - serin	3,01	3,13	1,61	1,72	1,07	0,71	4286
	Dns - valin	4,19	4,33	2,64	2,77	1,05	0,51	3237
	Dns - asparagová kys.	10,92	---	8,49	---	1,00	---	940
	Dns - methionin	3,89	4,03	2,38	2,51	1,05	0,54	3815
	Dns - leucin	4,06	4,30	2,53	2,74	1,08	0,71	3220
	Dns - glutamová kys.	6,37	---	4,54	---	1,00	---	435
pH 5,5	Dns - serin	1,94	---	0,69	---	1,00	---	937
	Dns - valin	2,41	---	1,10	---	1,00	---	851
	Dns - asparagová kys.	4,27	---	2,71	---	1,00	---	804
	Dns - methionin	2,21	---	0,92	---	1,00	---	874
	Dns - leucin	2,33	2,40	1,02	1,08	1,06	0,45	3618
	Dns - glutamová kys.	2,58	---	1,25	---	1,00	---	628

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: 0,02 M fosfátový pufr / acetonitril (45/55, v/v); průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

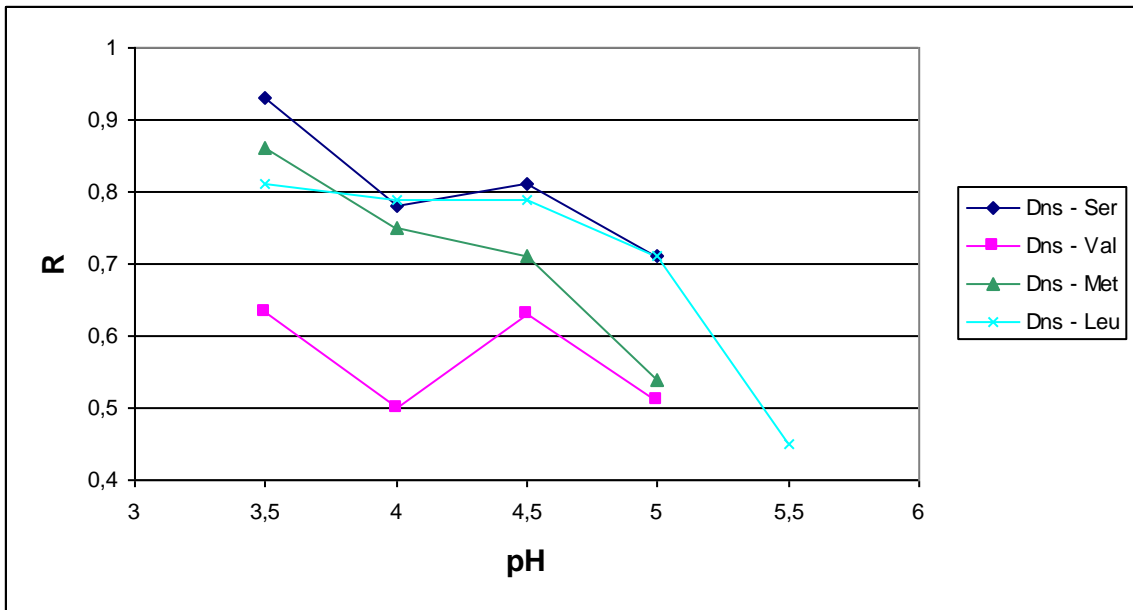
Graf 1: Graf závislosti retenčního faktoru D-enantiomerů (k_D) Dns-AK na pH pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



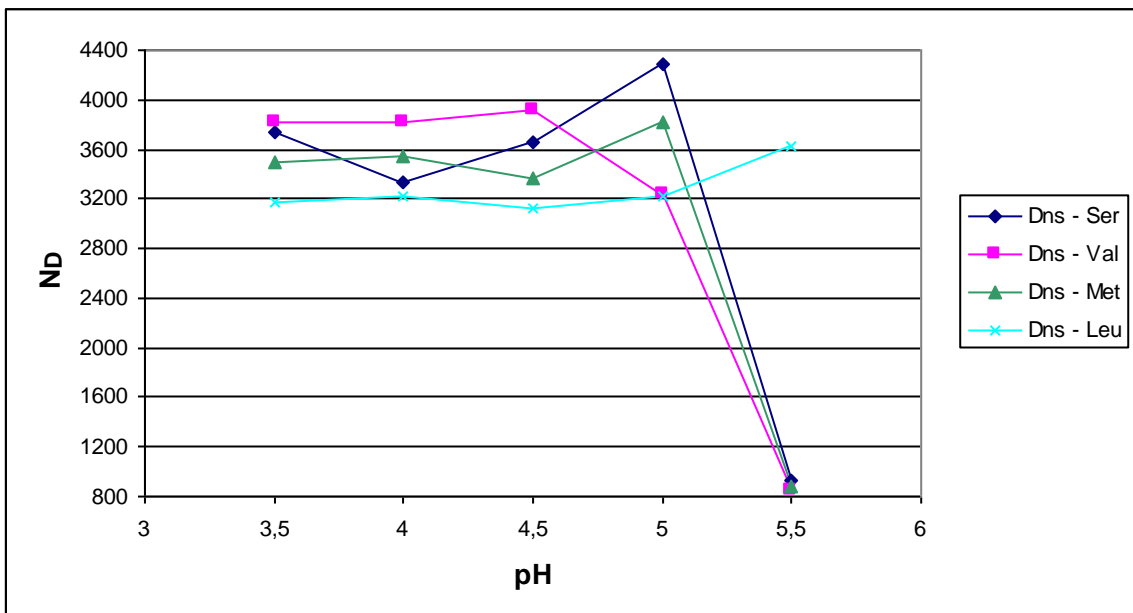
Graf 2: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery Dns-AK na pH pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



Graf 3: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů Dns-AK na pH pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



Graf 4: Graf závislosti účinnosti kolony pro D-enantiomery (N_D) Dns-AK na pH pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



4.1.2 Vliv obsahu organického modifikátoru

CSP na bázi 1-allyl-ergotaminu obsahuje mnoho skupin, která mají schopnost být akceptory nebo donory π elektronů. Bylo tedy otázkou, zda π - π interakce tvoří jednu ze stereoselektivních interakcí. Proto byl zkoumán vliv koncentrace acetonitrilu jako modifikátoru mobilní fáze. Acetonitril ovlivňuje sílu π - π interakcí při chromatografickém procesu tím, že sám funguje jako donor π elektronů.

Závislost koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi byla proměřena v rozmezí 45 až 60 % (tabulka 2, str. 32). S rostoucím množstvím acetonitrilu v mobilní fázi se retenční faktory snižují (graf 5, str. 33), ale enantioselektivita se v závislosti na rostoucí koncentraci acetonitrilu snižuje jen velmi málo (graf 6, str. 33). Naměřené hodnoty ukazují, že π - π interakce se retence účastní, ale jsou nestereoselektivní, tedy stejné pro oba enantiomery.

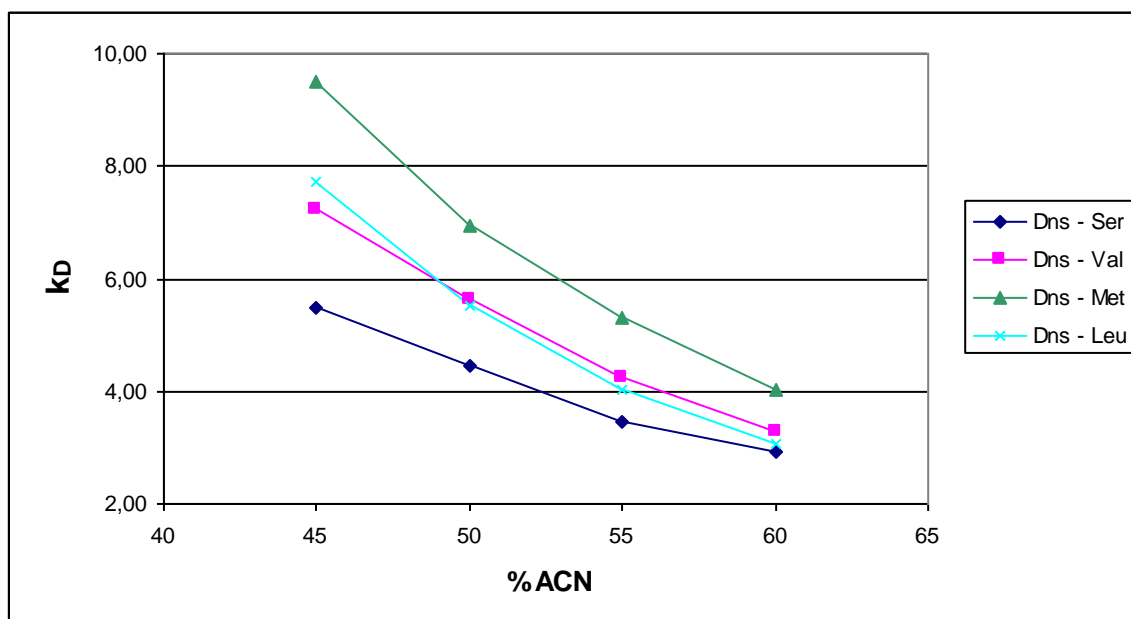
Pro sériové analýzy je proto výhodnější použití vyššího obsahu acetonitrilu, které vede ke zkrácení doby analýzy při zachování enantioselektivity. Příliš vysoký obsah acetonitrilu však vede k mírnému snížení rozlišení (graf 7, str. 34). Proto bylo pro další měření zvolen obsah acetonitrilu v mobilní fázi na 55 %. Závislost účinnosti kolony na koncentraci organického modifikátoru je znázorněno v grafu 8 na str. 34.

Tab. 2: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery dansylovaných aminokyselin v závislosti na koncentraci organického modifikátoru v mobilní fázi.

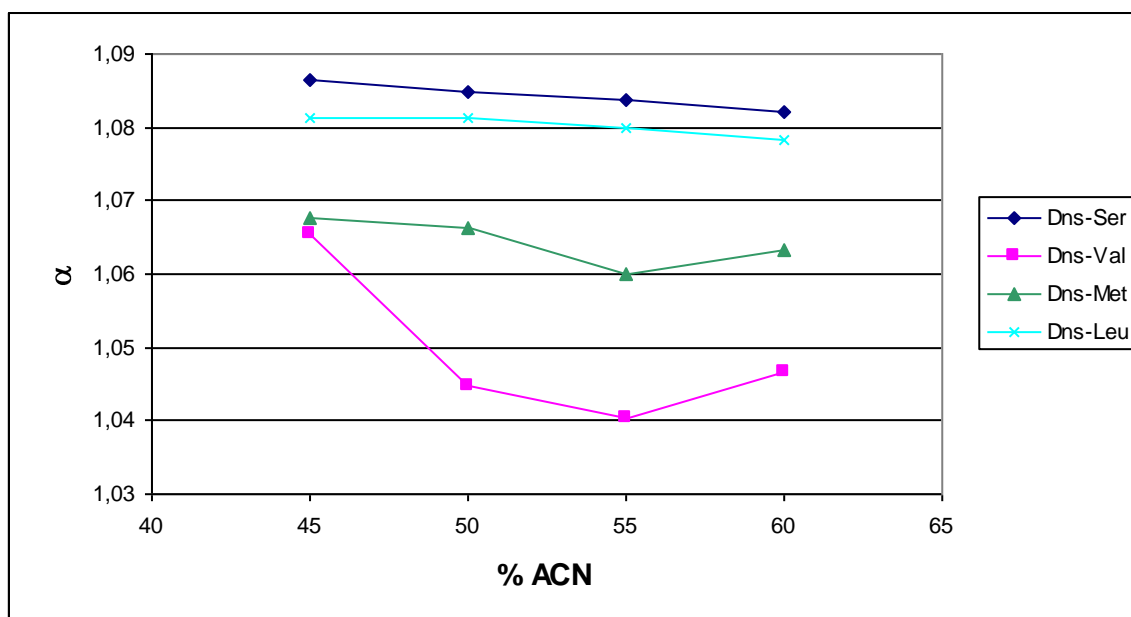
	Dns - AK	t_D	t_L	k_D	k_L	α	R	N_D
45% ACN	Dns - serin	7,45	7,99	5,48	5,95	1,09	0,92	2952
	Dns - valin	9,47	10,02	7,24	7,71	1,07	0,81	3758
	Dns - asparagová kys.	26,89	---	22,38	---	1,00	---	1074
	Dns - methionin	12,09	12,83	9,51	10,16	1,07	0,84	2841
	Dns - leucin	10,03	10,75	7,72	8,35	1,08	0,8	2630
	Dns - glutamová kys.	14,87	---	11,93	---	1,00	---	379
50% ACN	Dns - serin	6,27	6,71	4,45	4,83	1,08	0,79	3100
	Dns - valin	7,61	7,90	5,61	5,87	1,04	0,5	3501
	Dns - asparagová kys.	21,03	---	17,29	---	1,00	---	1046
	Dns - methionin	9,14	9,67	6,95	7,41	1,07	0,81	2852
	Dns - leucin	7,49	8,01	5,51	5,96	1,08	0,79	2804
	Dns - glutamová kys.	12,10	---	9,52	---	1,00	---	404
55% ACN	Dns - serin	5,13	5,46	3,46	3,75	1,08	0,78	3341
	Dns - valin	6,03	6,23	4,25	4,42	1,04	0,5	3813
	Dns - asparagová kys.	17,14	---	13,90	---	1,00	---	1084
	Dns - methionin	7,26	7,65	5,31	5,66	1,06	0,75	3546
	Dns - leucin	5,80	6,16	4,04	4,35	1,08	0,79	3219
	Dns - glutamová kys.	10,20	---	7,87	---	1,00	---	433
60% ACN	Dns - serin	4,52	4,80	2,93	3,17	1,08	0,80	3768
	Dns - valin	4,90	5,08	3,26	3,42	1,05	0,61	4113
	Dns - asparagová kys.	14,25	---	11,39	---	1,00	---	1071
	Dns - methionin	5,77	6,07	4,02	4,27	1,06	0,73	3834
	Dns - leucin	4,67	4,95	3,06	3,30	1,08	0,78	3493
	Dns - glutamová kys.	8,74	---	6,60	---	1,00	---	458

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: 0,02 M fosfátový pufr (pH 4,0) / acetonitril; průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

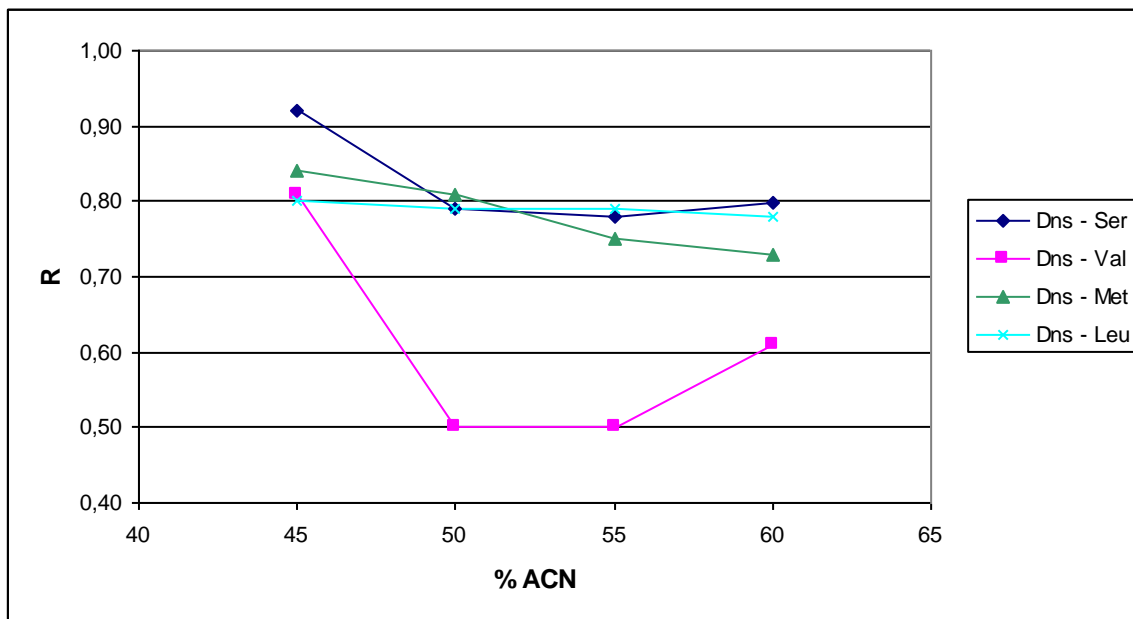
Graf 5: Graf závislosti retenčního faktoru D-enantiomerů (k_D) Dns-AK na koncentraci organického modifikátoru (% ACN) v mobilní fázi.



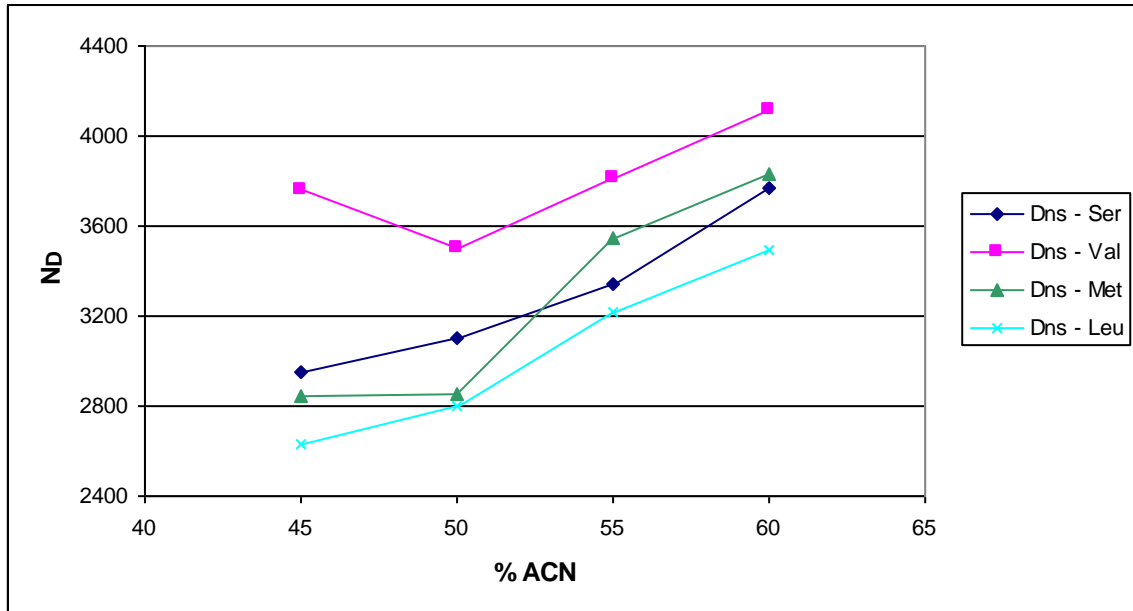
Graf 6: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery Dns-AK na koncentraci organického modifikátoru (% ACN) v mobilní fázi.



Graf 7: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů Dns-AK na koncentraci organického modifikátoru (% ACN) v mobilní fázi.



Graf 8: Graf závislosti účinnosti kolony pro D-enantiomery (N_D) Dns-AK na koncentraci organického modifikátoru (% ACN) v mobilní fázi.



4.1.3 Vliv koncentrace pufru

Koncentrace pufru - iontová síla mobilní fáze ovlivňuje elektrostatické interakce mezi analytem a ionty stacionární fáze. V tomto případě interagují nabitě karboxylové skupiny AK s protonizovaným dusíkem na CSP. Dále iontová síla snižuje množství reverzních interakcí. Chromatografické parametry byly měřeny při koncentraci pufru v rozmezí 10 až 50 mM H_3PO_4 (tabulka 3).

Zvyšování iontové síly vede k poklesu enantioselektivity (graf 10, str. 36) v řádech setin u Leu, Met a Val, výjimkou je Ser, kde došlo k jejímu nárůstu. Pokles je nejspíše dán zeslabením stereoselektivní interakce karboxylové skupiny a CSP, jak bylo ukázáno při testování vlivu pH (kap. 4.1.1)

Zvyšování koncentrace pufru vede obecně u všech analytů ke zkracování retenčních časů (graf 9, str. 36). Hodnoty rozlišení a účinnosti kolony, které se s rostoucí koncentrací pufru zvyšují, jsou znázorněny v grafech 11 a 12 na str. 37.

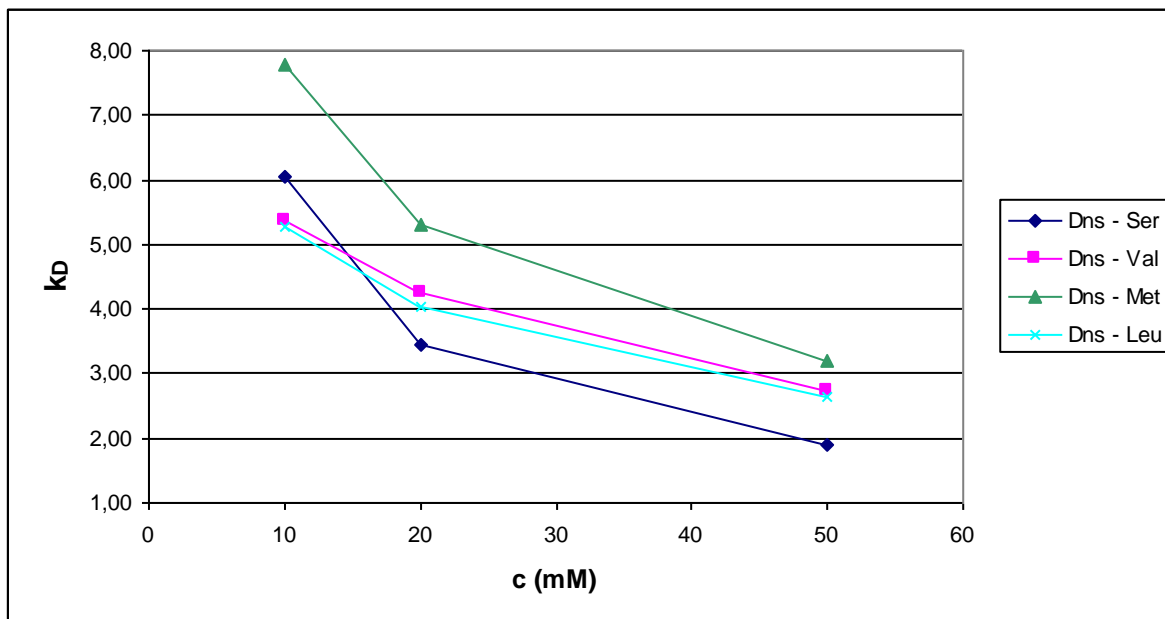
Optimální hodnota koncentrace pufru pro separaci byla vyhodnocena jako 20 mM.

Tab. 3: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery dansylovaných aminokyselin v závislosti na koncentraci pufru H_3PO_4 .

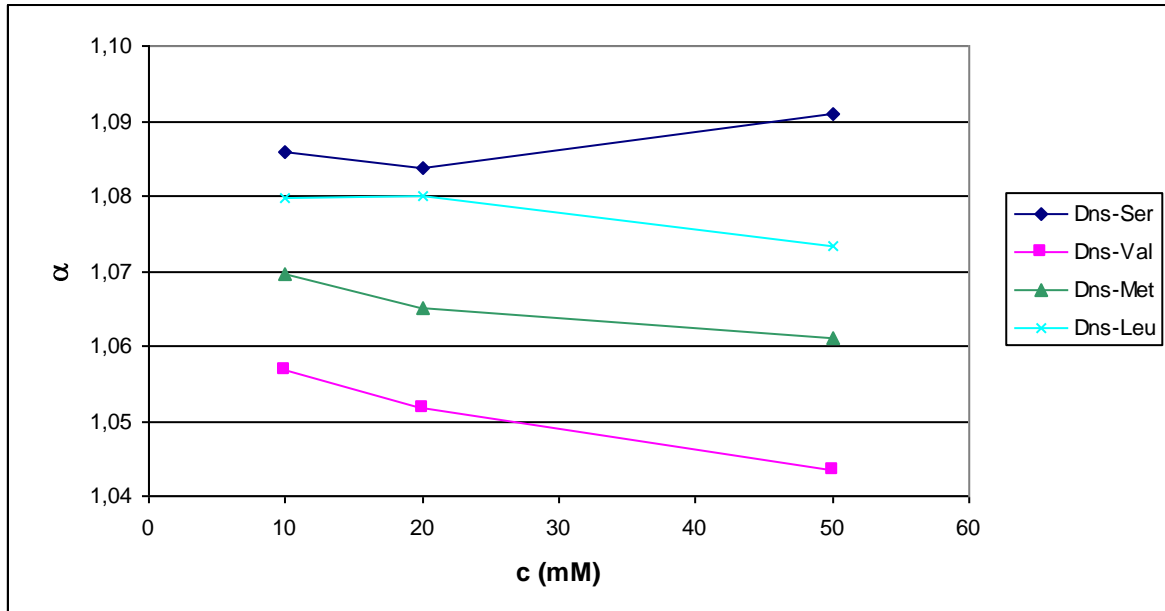
	Dns - AK	t_D	t_L	k_D	k_L	α	R	N_D
10 mM H_3PO_4	Dns - serin	8,09	8,69	6,04	6,56	1,09	0,90	3299
	Dns - valin	7,31	7,66	5,35	5,66	1,06	0,80	3977
	Dns - asparagová kys.	30,47	---	25,50	---	1,00	---	1035
	Dns - methionin	10,12	10,74	7,80	8,34	1,07	0,89	3328
	Dns - leucin	7,22	7,71	5,28	5,70	1,08	0,81	3058
	Dns - glutamová kys.	16,23	---	13,12	---	1,00	---	399
20 mM H_3PO_4	Dns - serin	5,13	5,46	3,46	3,75	1,08	0,78	3341
	Dns - valin	6,32	6,59	4,25	4,42	1,05	0,62	3813
	Dns - asparagová kys.	18,29	---	13,90	---	1,00	---	1084
	Dns - methionin	7,26	7,65	5,31	5,66	1,07	0,88	3546
	Dns - leucin	6,13	6,53	4,04	4,35	1,08	0,80	3219
	Dns - glutamová kys.	11,07	---	7,87	---	1,00	---	433
50 mM H_3PO_4	Dns - serin	3,35	3,55	1,91	2,09	1,09	0,86	4299
	Dns - valin	4,29	4,43	2,73	2,85	1,04	0,51	4710
	Dns - asparagová kys.	8,28	---	6,20	---	1,00	---	1452
	Dns - methionin	4,83	5,05	3,20	3,39	1,06	0,73	4088
	Dns - leucin	4,17	4,39	2,63	2,82	1,07	0,79	3892
	Dns - glutamová kys.	5,60	---	3,87	---	1,00	---	571

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: fosfátový pufr (pH 4,0) / acetonitril (45/55 v/v); průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

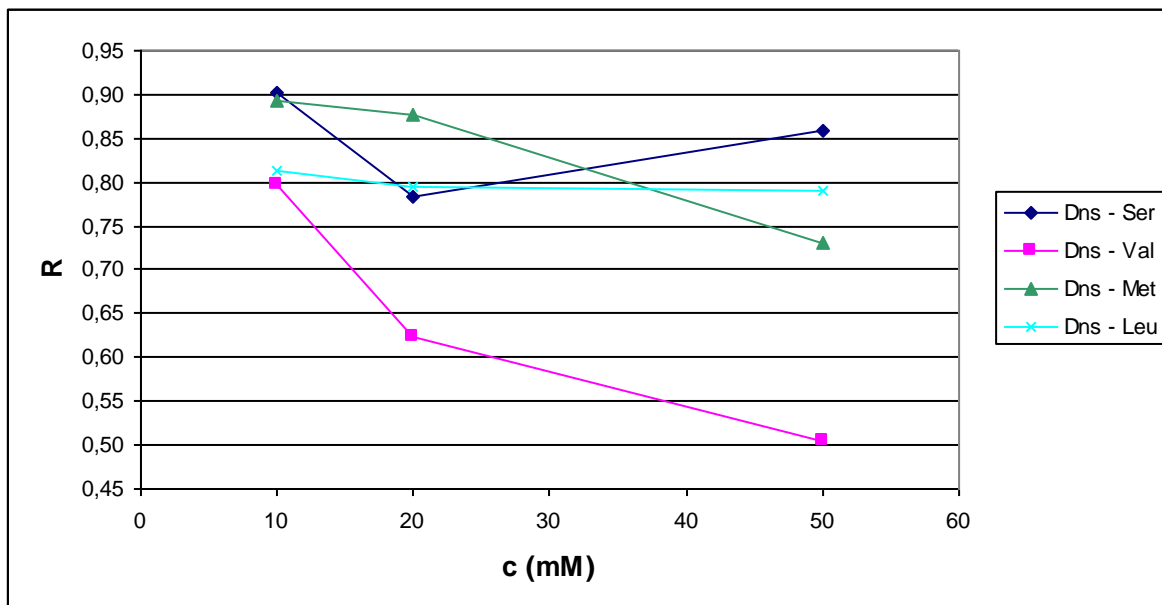
Graf 9: Graf závislosti retenčního faktoru D-enantiomerů (k_D) Dns-AK na koncentraci pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



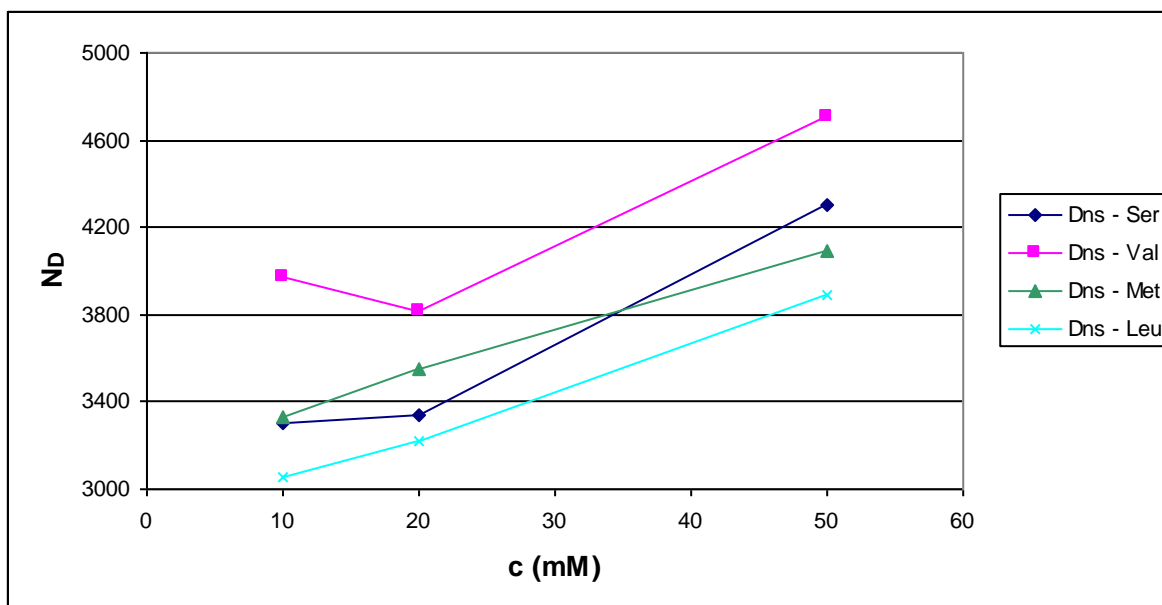
Graf 10: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery Dns-AK na koncentraci pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .

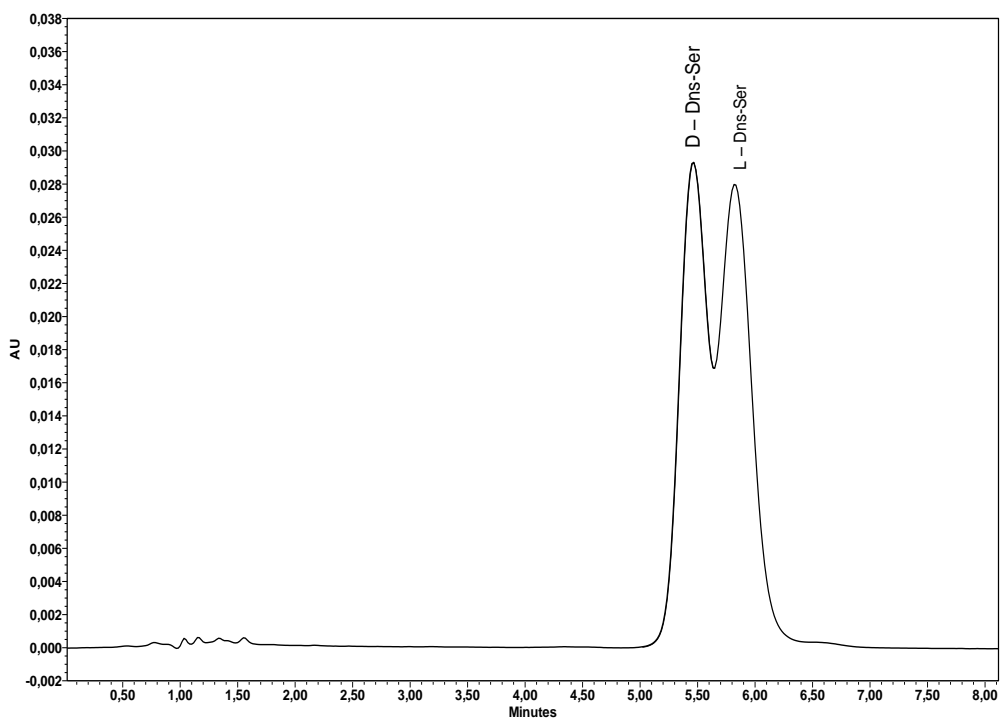


Graf 11: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů Dns-AK na koncentraci pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



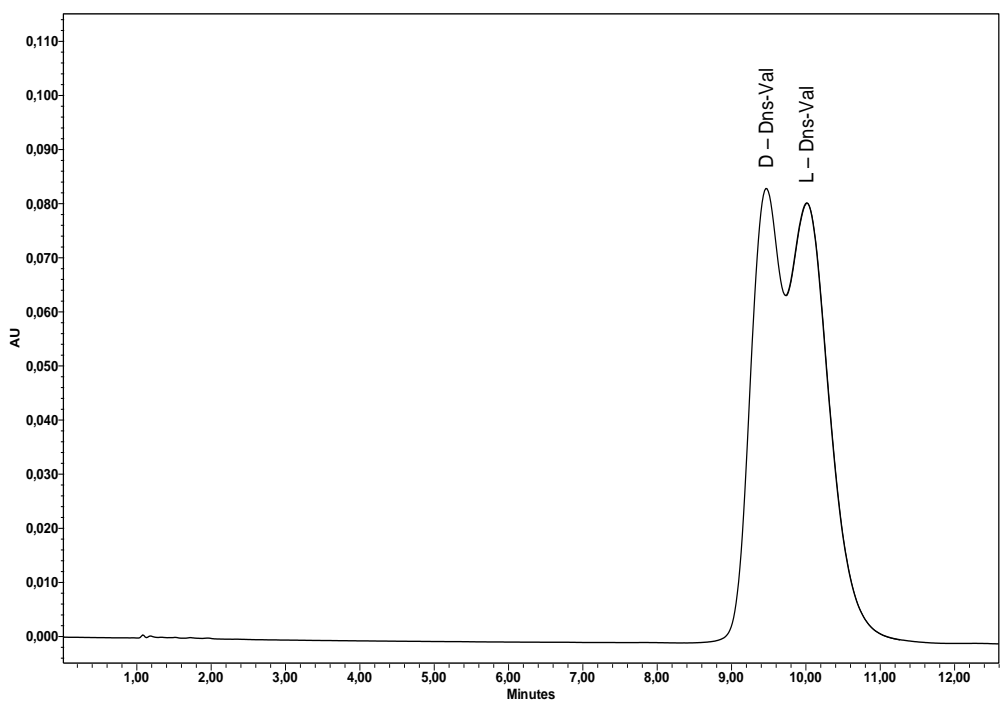
Graf 12: Graf závislosti účinnosti kolony pro D-enantiomery (N_D) Dns-AK na koncentraci pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.





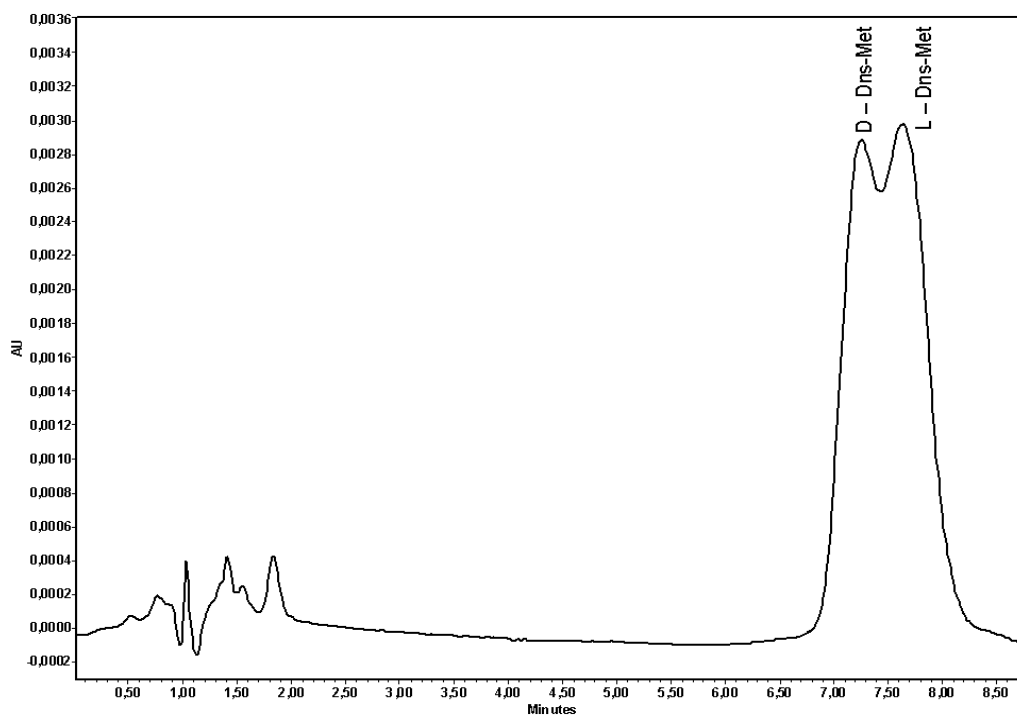
Obr. 10: Enantioseparace Dns-Ser.

Chromatografické podmínky: velikost kolony 150 x 4,6 mm I.D.; tlak plnění 40 MPa; mobilní fáze: 20 mM fosfátový pufr (pH 4,0)/acetonitril (45/55, v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV při 254 nm; teplota 25 °C.



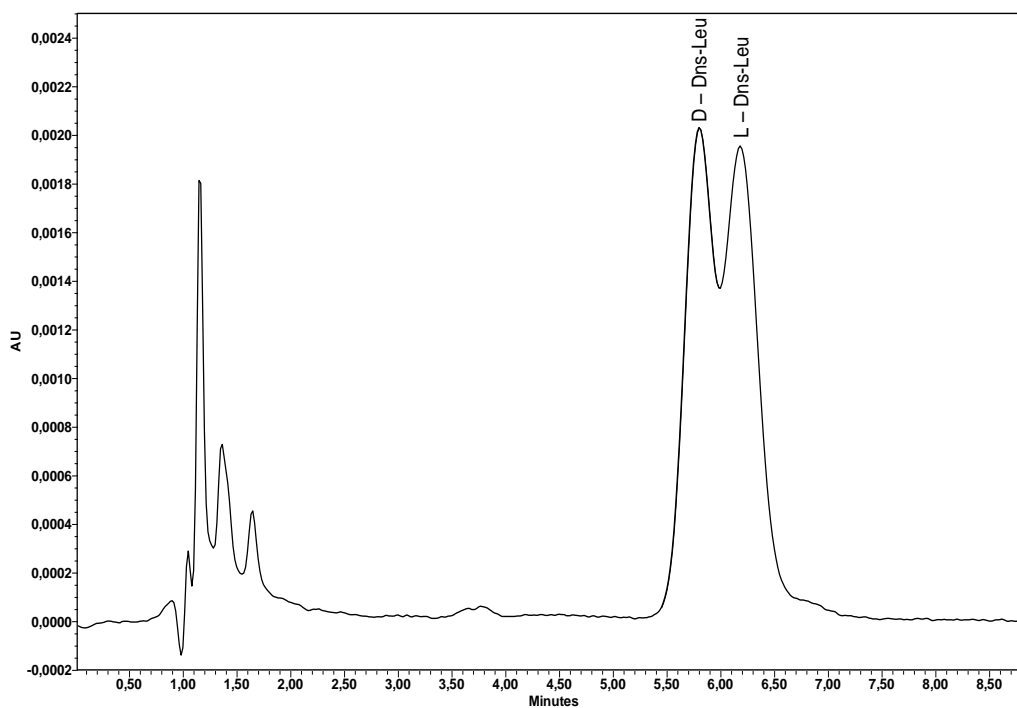
Obr. 11: Enantioseparace Dns-Val.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 10.



Obr.12: Enantioseparace Dns-Met.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 10.



Obr.13: Enantioseparace Dns-Leu.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 10.

4.2 Optimalizace podmínek pro dělení herbicidů

Pro herbicidy (obrázek 9, str. 22) byly prováděny dvě série měření s odlišným složením mobilní fáze. První série měření byla prováděna v mobilní fázi složené z fosfátového pufru a methanolu a druhá série v acetátovém pufru a acetonitrilu. Při použití mobilní fáze acetátový pufr/acetonitril nebylo enantioseparace dosaženo (data neuvedena).

Následující studie je uvedena pro mobilní fázi fosfátový pufr/methanol. Za těchto podmínek se úspěšně separovaly enantiomery *Fluazifopu*, *Diclofopu*, *Haloxifopu* a *Fenoxapropu*. Enantiomery *Mecopropu*, *Dichlorpropu*, *Fenopropu* a *Flampropu* se nedělily vůbec, což je nespíše dáno, oproti ostatním zkoumaným látkám, jejich celkově menší velikostí. Jejich struktury obsahují jen jedno benzenové jádro, nebo jsou jejich benzenová jádra jinak uspořádána (*Flamprop*). Jejich retenční faktory byly ve srovnání se separovanými enantiomery 2x menší. Prostorová geometrie látek vykazujících lepší enantioseparaci (*Fluazifop*, *Diclofop*, *Haloxifop*, *Fenoxaprop*) pravděpodobně podporuje tvorbu chirálních interakcí díky rigidnímu uspořádání benzenových jader přes éterickou vazbu.

Podmínky pro enantioseparaci pesticidů byly vybrány na základě studie vlivu pH, iontové síly pufru a obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi. Vybrané chromatogramy enantioseparace herbicidů jsou uvedeny na obrázcích 14 – 17 na str. 52, 53.

4.2.1 Vliv pH

U derivátů herbicidů byla sledována závislost retenčních faktorů, separačního faktoru, rozlišení a účinnosti kolony na pH pufru v oblasti 4,0 až 6,0 (tabulka 4, str. 42).

Retenční faktory všech studovaných herbicidů klesají se zvyšujícím se pH (graf 13, str. 43). Enantioselektivita se ve stanoveném rozmezí snižuje jen nepatrně (graf 14, str.43), rozlišení také mírně klesá (graf 15, str. 44). Závislosti účinnosti kolony pro R-enantiomery herbicidů na pH pufru je uvedeno v grafu 16 na str. 44.

Studované látky, jejichž pKa je v rozmezí 2,8 až cca 4,9 jsou v použitém rozmezí pH převážně ve svých disociovaných formách. Opět se zde nejspíše uplatňuje elektrostatická interakce nabitě karboxylové skupiny herbicidů s protonizovaným dusíkem v pozici N6 na CSP. Zkracování retenčních časů při přechodu k vyšším pH mobilní fáze by se dalo opět vysvětlit snížením protonizace interakčního dusíku na CSP. Tato elektrostatická interakce je nejspíše stereoselektivní, jak ukazuje snižování enantioselektivity v závislosti na zvyšujícím se pH. Stereoselektivní interakce disociované karboxylové skupiny herbicidů s chirálním selektorem byla již ukázána při separaci herbicidů na 1-allyl-terguridu [33].

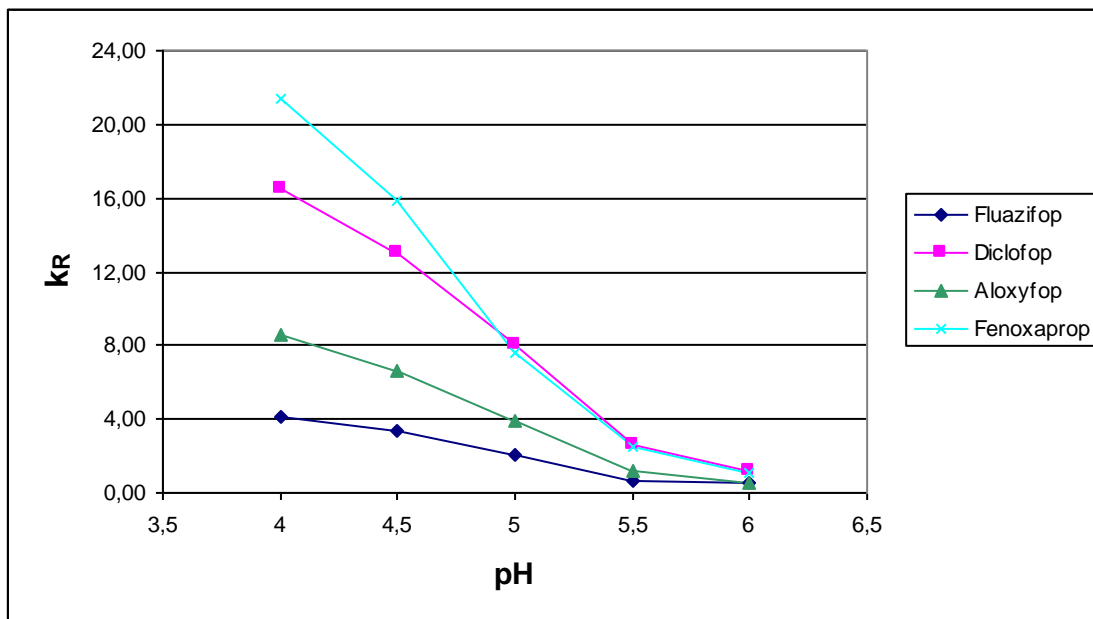
Optimální hodnota pH pro další měření byla vyhodnocena jako 5,0.

Tab. 4: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery herbicidů jako funkce pH pufru H₃PO₄/KH₂PO₄.

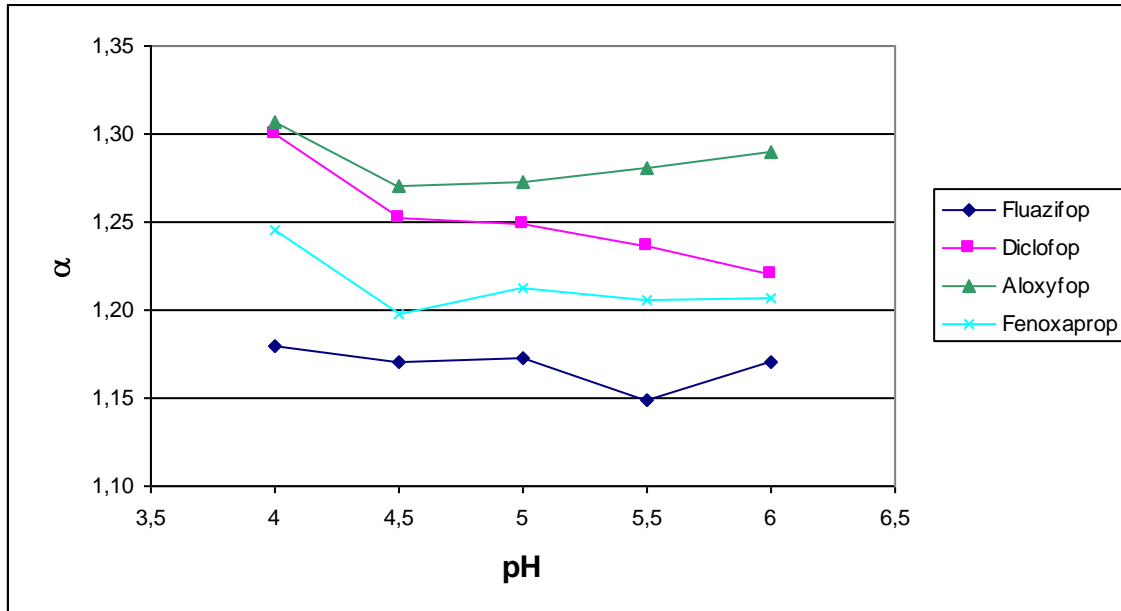
	Herbicidy	t_R	t_S	k_R	k_S	α	R	N_R
pH 4,0	Mecoprop	5,54	***	3,82	***	1,00	***	389
	Dichlorprop	5,56	***	3,83	***	1,00	***	572
	Fenoprop	8,32	***	6,24	***	1,00	***	705
	Fluazifop	5,94	6,80	4,16	4,91	1,18	1,19	1516
	Flamprop	7,67	***	5,67	***	1,00	***	1305
	Diclofop	20,09	25,76	16,47	21,40	1,30	1,53	854
	Haloxyfop	11,03	14,06	8,59	11,22	1,31	1,8	981
	Fenoxaprop	25,74	31,77	21,38	26,63	1,25	1,55	868
pH 4,5	Mecoprop	4,66	***	3,05	***	1,00	***	415
	Dichlorprop	5,19	***	3,51	***	1,00	***	627
	Fenoprop	7,76	***	5,75	***	1,00	***	620
	Fluazifop	5,04	5,71	3,38	3,96	1,17	0,99	1316
	Flamprop	6,54	***	4,68	***	1,00	***	1181
	Diclofop	16,15	19,94	13,05	16,34	1,25	1,32	682
	Haloxyfop	8,71	10,76	6,58	8,35	1,27	1,44	816
	Fenoxaprop	19,37	22,97	15,84	18,98	1,20	1,12	736
pH 5,0	Mecoprop	3,74	***	2,25	***	1,00	***	543
	Dichlorprop	3,68	***	2,20	***	1,00	***	662
	Fenoprop	5,06	***	3,40	***	1,00	***	695
	Fluazifop	3,48	3,88	2,03	2,37	1,17	0,87	1222
	Flamprop	4,57	***	2,97	***	1,00	***	1259
	Diclofop	10,38	12,67	8,03	9,99	1,25	1,34	810
	Haloxyfop	5,64	6,87	3,90	4,97	1,27	1,47	1004
	Fenoxaprop	9,95	11,82	7,65	9,27	1,21	1,23	934
pH 5,5	Mecoprop	2,94	***	1,56	***	1,00	***	432
	Dichlorprop	2,35	***	1,04	***	1,00	***	559
	Fenoprop	2,62	***	1,28	***	1,00	***	557
	Fluazifop	1,84	1,95	0,60	0,69	1,15	0,83	1159
	Flamprop	2,18	***	0,90	***	1,00	***	1013
	Diclofop	4,17	4,88	2,62	3,24	1,24	1,00	893
	Haloxyfop	2,54	2,93	1,21	1,55	1,28	1,06	1141
	Fenoxaprop	4,05	4,65	2,52	3,04	1,21	0,96	1100
pH 6,0	Mecoprop	1,43	***	0,24	***	1,00	***	813
	Dichlorprop	1,43	***	0,25	***	1,00	***	884
	Fenoprop	1,65	***	0,44	***	1,00	***	803
	Fluazifop	1,08	1,40	0,52	0,22	1,17	0,81	1809
	Flamprop	1,51	***	0,31	***	1,00	***	629
	Diclofop	2,55	2,86	1,22	1,49	1,22	0,91	1375
	Haloxyfop	1,72	1,88	0,49	0,64	1,29	***	***
	Fenoxaprop	2,46	2,73	1,14	1,37	1,21	***	***

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: 0,02 M fosfátový pufr / methanol (45/55, v/v); průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

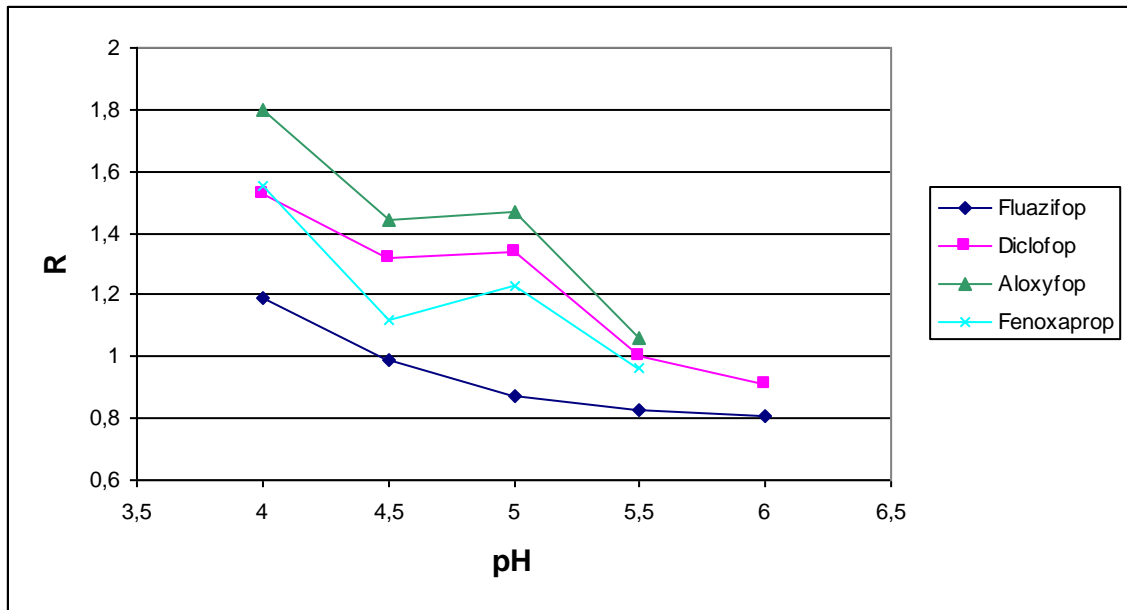
Graf 13: Graf závislosti retenčního faktoru R-enantiomerů (k_R) herbicidů na pH pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



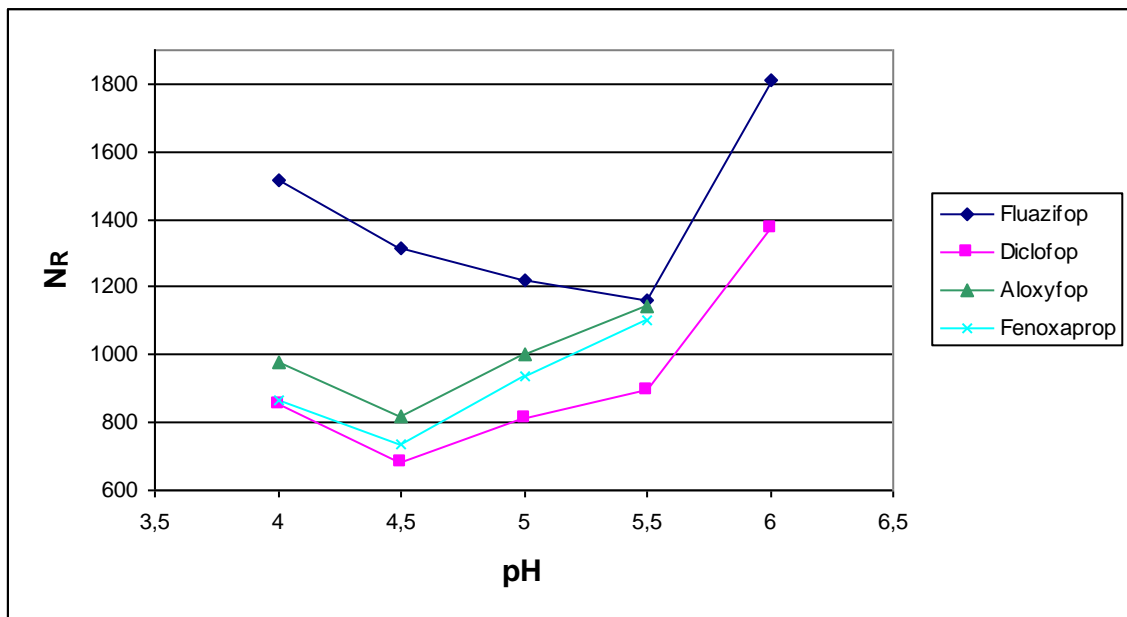
Graf 14: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery herbicidů na pH pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



Graf 15: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů herbicidů na pH pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



Graf 16: Graf závislosti účinnosti kolony pro R-enantiomery (N_R) herbicidů na pH pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



4.2.2 Vliv obsahu organického modifikátoru

Použití acetonitrilu jako modifikátoru bylo neúspěšné, nejspíše protože eluuje separované látky z použité CSP příliš rychle. Proto byl jako organický modifikátor použit více polární methanol.

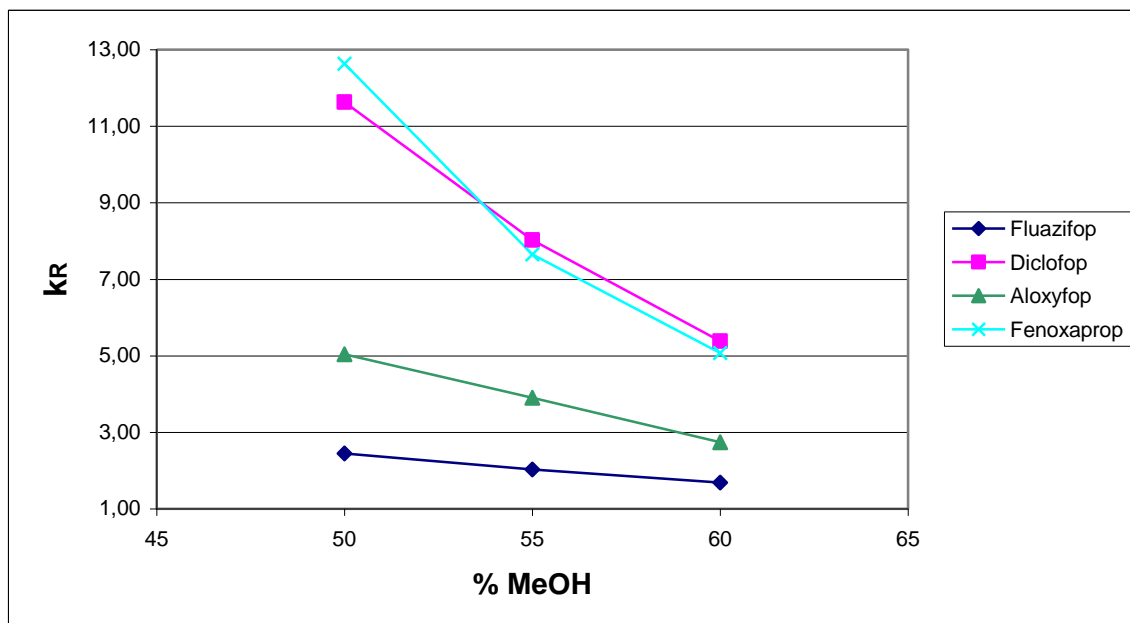
Závislost koncentrace methanolu v mobilní fázi byla proměřena v rozmezí 50 až 60 % (tabulka 5, str. 46). Methanol ovlivňuje intenzitu π - π interakcí při chromatografickém procesu. S rostoucím množstvím methanolu se retenční faktory snižují (graf 17, str. 47). Enantioselektivita je v závislosti na koncentraci methanolu konstantní (graf 18, str. 47). Naměřené hodnoty ukazují, že π - π interakce jsou nestereoselektivní, tedy stejné pro oba enantiomery a ovlivňují jen dobu retence. Pro sériové analýzy je proto výhodnější použití vyššího obsahu methanolu, které vede ke zkrácení doby analýzy při zachování enantioselektivity. Proto bylo pro další měření zvolen obsah methanolu v mobilní fázi na 55 %. Nejvyšších hodnot rozlišení bylo dosaženo v 55 % methanolu v mobilní fázi (graf 19, str. 48). Závislost účinnosti kolony na koncentraci organického modifikátoru je znázorněno v grafu 20 na str. 48.

Tab. 5: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery herbicidů v závislosti na koncentraci organického modifikátoru v mobilní fázi.

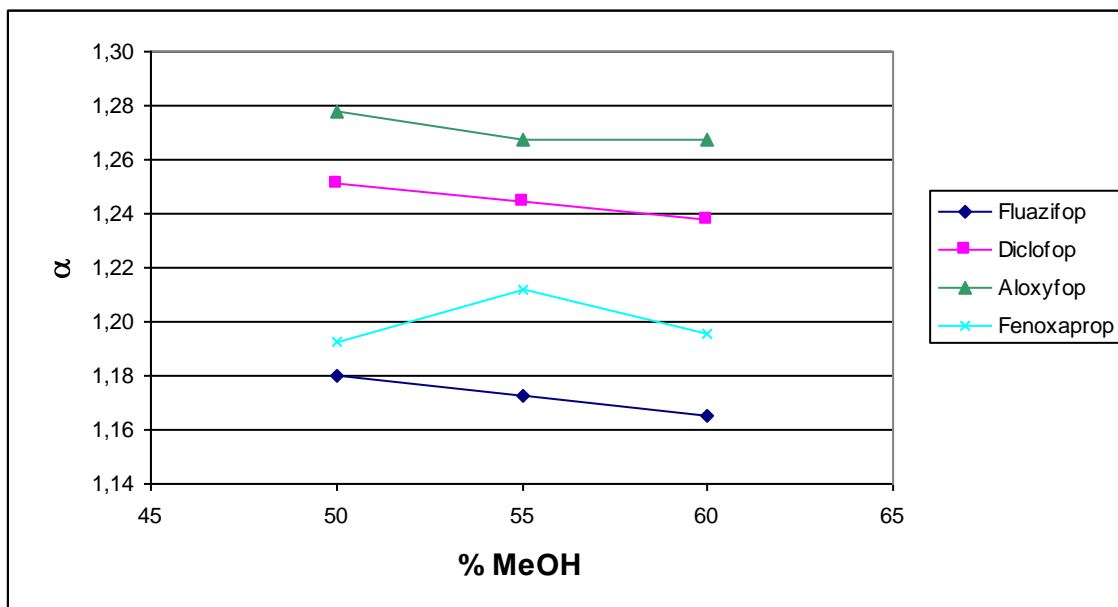
	Herbicidy	t_R	t_S	k_R	k_S	α	R	N_R
50% MeOH	Mecoprop	4,48	***	2,89	***	1,00	***	399
	Dichlorprop	3,85	***	2,34	***	1,00	***	511
	Fenoprop	5,78	***	4,03	***	1,00	***	512
	Fluazifop	3,96	4,47	2,44	2,88	1,18	0,87	1306
	Flamprop	4,92	***	3,28	***	1,00	***	962
	Diclofop	14,52	17,88	11,63	14,55	1,25	1,21	606
	Haloxifop	6,94	8,55	5,04	6,44	1,28	1,34	740
	Fenoxaprop	15,68	18,47	12,63	15,06	1,19	0,96	670
55% MeOH	Mecoprop	3,74	***	2,25	***	1,00	***	543
	Dichlorprop	3,68	***	2,20	***	1,00	***	662
	Fenoprop	5,06	***	3,40	***	1,00	***	695
	Fluazifop	3,48	3,88	2,03	2,37	1,17	0,87	1222
	Flamprop	4,57	***	2,97	***	1,00	***	1259
	Diclofop	10,38	12,63	8,03	9,99	1,24	1,34	810
	Haloxifop	5,64	6,87	3,90	4,97	1,27	1,47	1004
	Fenoxaprop	9,95	11,82	7,65	9,27	1,21	1,23	934
60% MeOH	Mecoprop	3,64	***	2,17	***	1,00	***	483
	Dichlorprop	3,57	***	2,11	***	1,00	***	785
	Fenoprop	4,46	***	2,87	***	1,00	***	808
	Fluazifop	3,08	3,40	1,68	1,96	1,17	0,84	799
	Flamprop	3,86	***	2,36	***	1,00	***	1244
	Diclofop	7,34	8,81	5,38	6,66	1,24	1,28	882
	Haloxifop	4,30	5,15	2,74	3,48	1,27	1,41	1116
	Fenoxaprop	6,98	8,12	5,07	6,06	1,20	1,17	1115

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: 0,02 M fosfátový pufr (pH 5,0) / methanol; průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

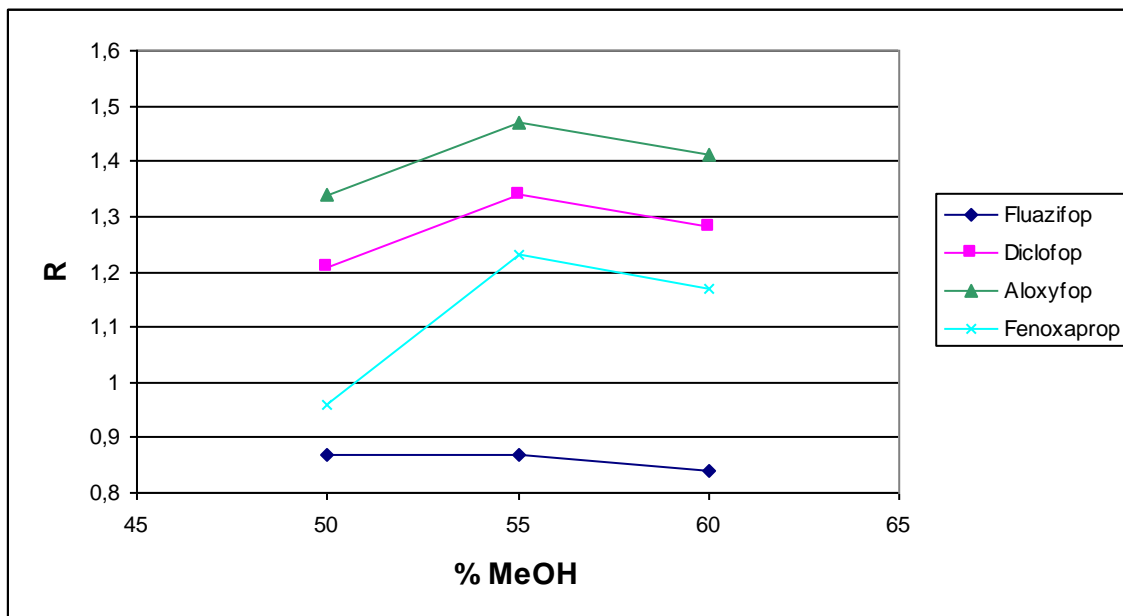
Graf 17: Graf závislosti retenčního faktoru R-enantiomerů (k_R) herbicidů na koncentraci organického modifikátoru (% MeOH) v mobilní fázi.



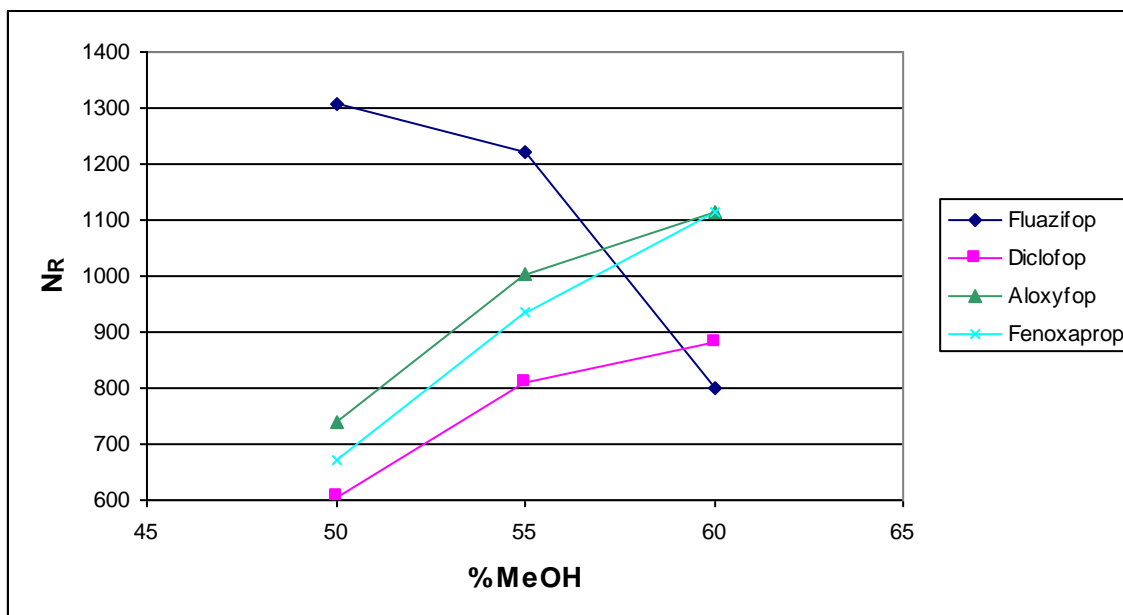
Graf 18: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery herbicidů na koncentraci organického modifikátoru (% MeOH) v mobilní fázi.



Graf 19: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů herbicidů na koncentraci organického modifikátoru (% MeOH) v mobilní fázi.



Graf 20: Graf závislosti účinnosti kolony pro R-enantiomery (N_R) herbicidů na koncentraci organického modifikátoru (% MeOH) v mobilní fázi.



4.1.3 Vliv koncentrace pufru

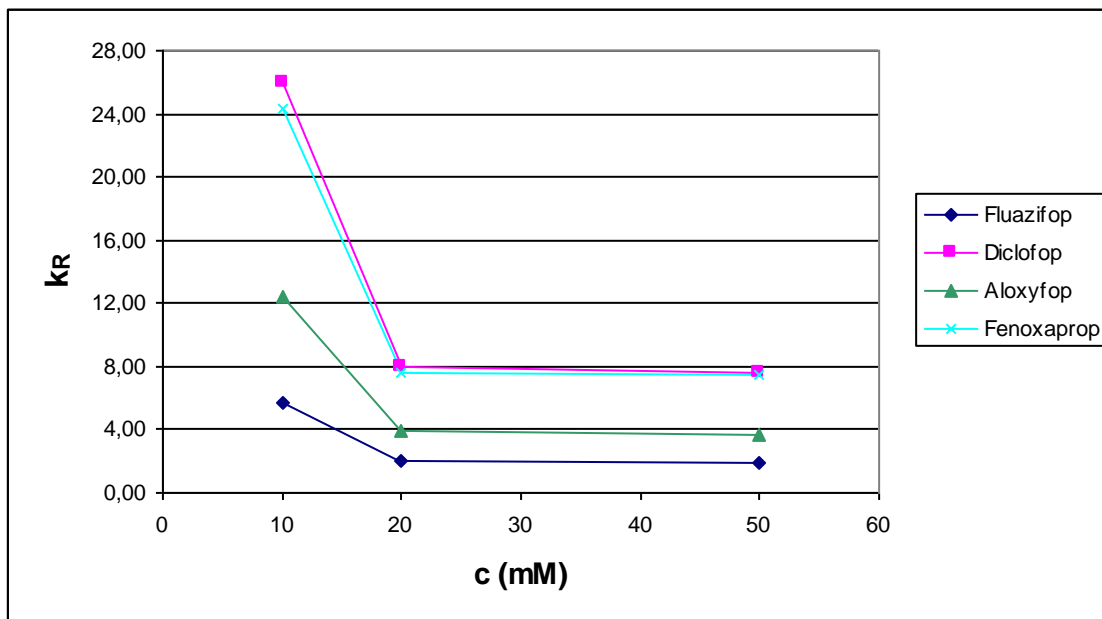
Koncentrace pufru (iontová síla) mobilní fáze ovlivňuje elektrostatické interakce mezi analytem a ionty stacionární fáze. Dále snižuje množství reverzních interakcí. Závislost koncentrace pufru byla proměřena v rozmezí 10 až 50 mM H₃PO₄ (tabulka 6). Zvyšování koncentrace pufru vede nejprve k prudkému zkrácení retenčních časů a pak se už dále nemění (graf 21, str. 50), enantioselektivita zůstává přibližně stejná nebo se mírně klesá (graf 22, str. 50). Hodnoty rozlišení a účinnosti kolony, které se ze zvyšující koncentrací pufru zvyšují jsou znázorněny v grafech 23 a 24 na str. 51.

Tab. 6: Retenční charakteristika, enantioselektivita, hodnota rozlišení a účinnosti kolony pro enantiomery herbicidů v závislosti na koncentraci pufru H₃PO₄/KH₂PO₄.

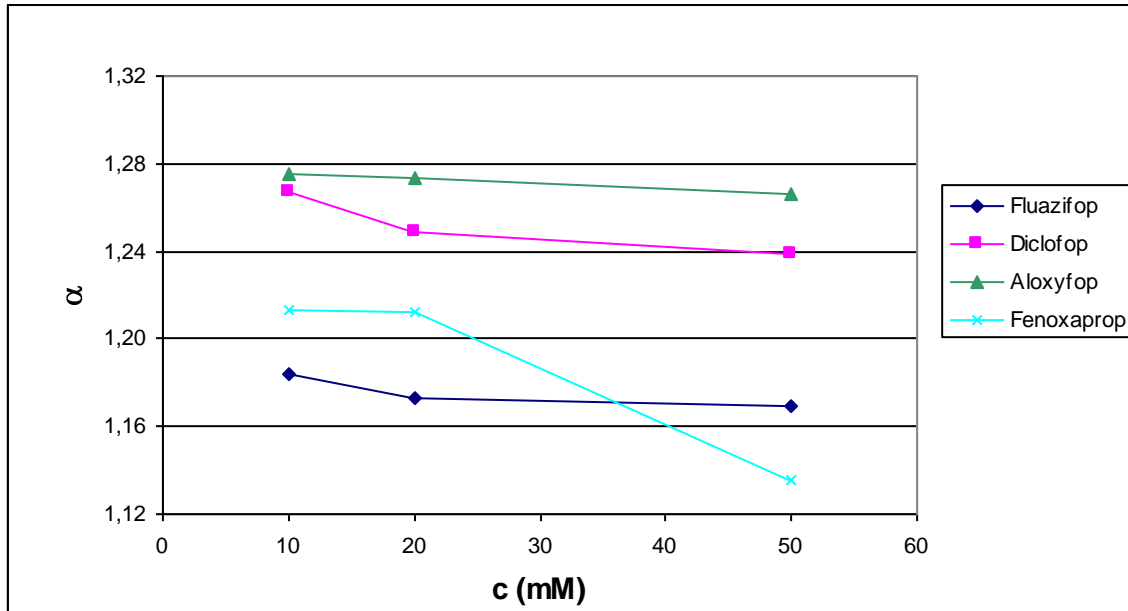
	Herbicidy	t_R	t_S	k_R	k_S	α	R	N_R
10 mM H₃PO₄	Mecoprop	5,97	***	4,19	***	1,00	***	287
	Dichlorprop	6,89	***	4,99	***	1,00	***	439
	Fenoprop	10,89	***	8,47	***	1,00	***	529
	Fluazifop	7,64	8,83	5,64	6,68	1,18	1,17	1266
	Flamprop	10,00	***	7,70	***	1,00	***	1354
	Diclofop	31,08	39,07	26,02	32,97	1,26	1,38	743
	Haloxyfop	15,45	19,38	12,43	15,86	1,28	1,63	872
	Fenoxaprop	29,06	35,02	24,27	29,45	1,21	1,49	955
20 mM H₃PO₄	Mecoprop	3,74	***	2,25	***	1,00	***	543
	Dichlorprop	3,68	***	2,20	***	1,00	***	662
	Fenoprop	5,06	***	3,40	***	1,00	***	695
	Fluazifop	3,48	3,88	2,03	2,37	1,17	0,87	1222
	Flamprop	4,57	***	2,97	***	1,00	***	1259
	Diclofop	10,38	12,67	8,03	9,99	1,25	1,34	810
	Haloxyfop	5,64	6,87	3,90	4,97	1,27	1,47	1004
	Fenoxaprop	9,95	11,82	7,65	9,27	1,21	1,23	934
50 mM H₃PO₄	Mecoprop	3,45	***	2,00	***	1,00	***	552
	Dichlorprop	3,60	***	2,13	***	1,00	***	899
	Fenoprop	4,96	***	3,31	***	1,00	***	897
	Fluazifop	3,39	3,76	1,94	2,27	1,17	0,97	1919
	Flamprop	4,33	***	2,76	***	1,00	***	1303
	Diclofop	9,88	11,96	7,59	9,40	1,24	1,42	1018
	Haloxyfop	5,37	6,49	3,67	4,64	1,27	1,57	1210
	Fenoxaprop	9,74	10,90	7,47	8,48	1,14	0,88	1111

Chromatografické podmínky: mobilní fáze: fosfátový pufr (pH 5,0) / methanol (45/55 v/v); průtoková rychlost 1,0 ml/min; UV 254 nm; teplota 25 °C.

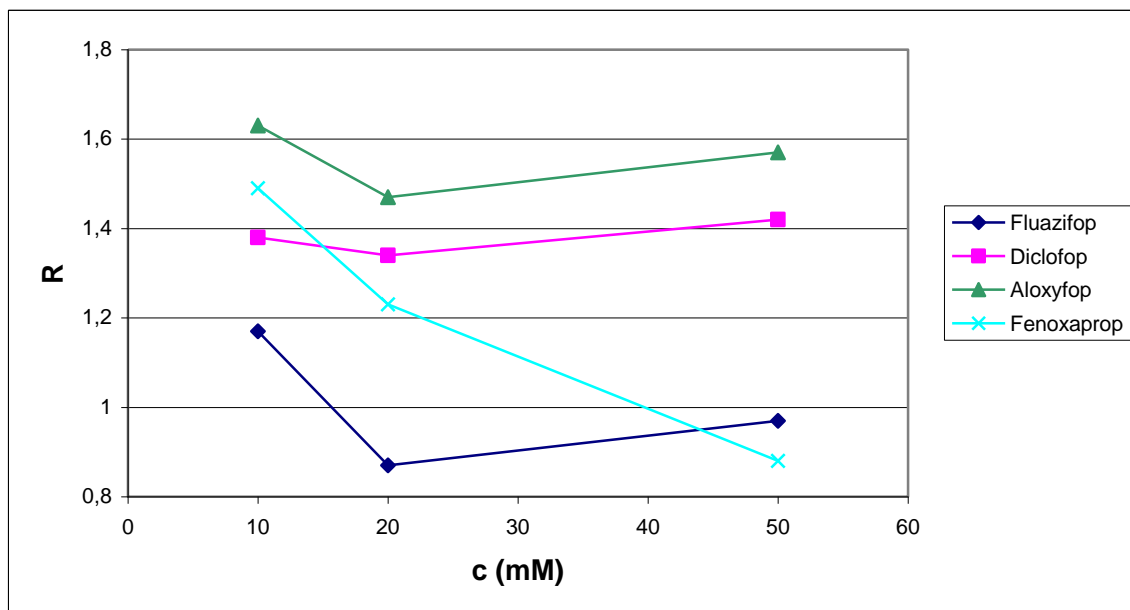
Graf 21: Graf závislosti retenčního faktoru R-enantiomerů (k_R) herbicidů na koncentraci pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .



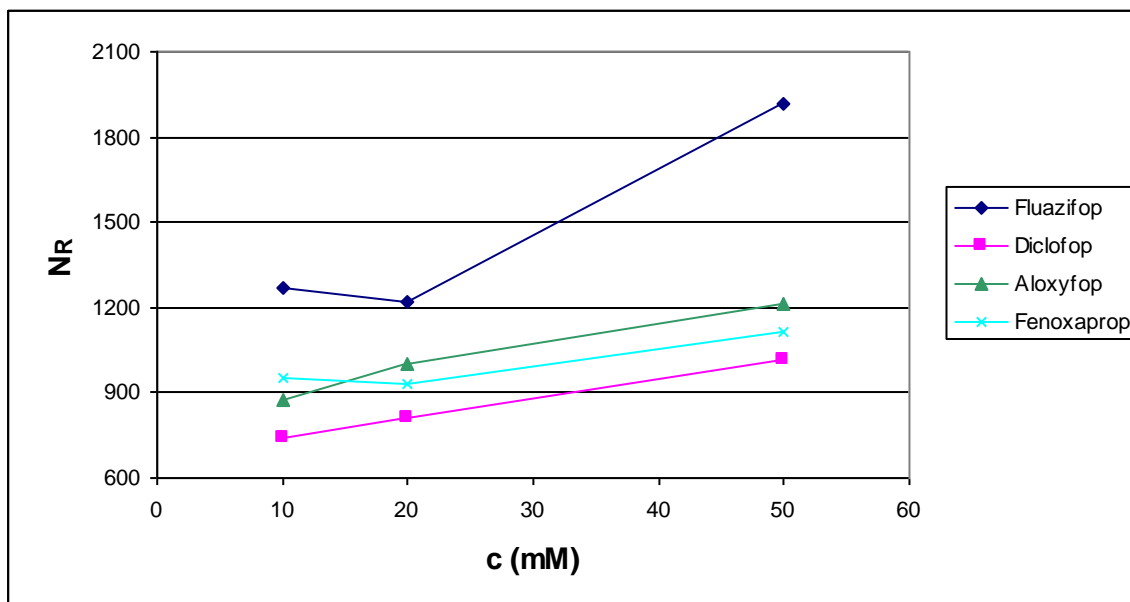
Graf 22: Graf závislosti enantioselektivity (α) pro enantiomery herbicidů na koncentraci pufru H_3PO_4/KH_2PO_4 .

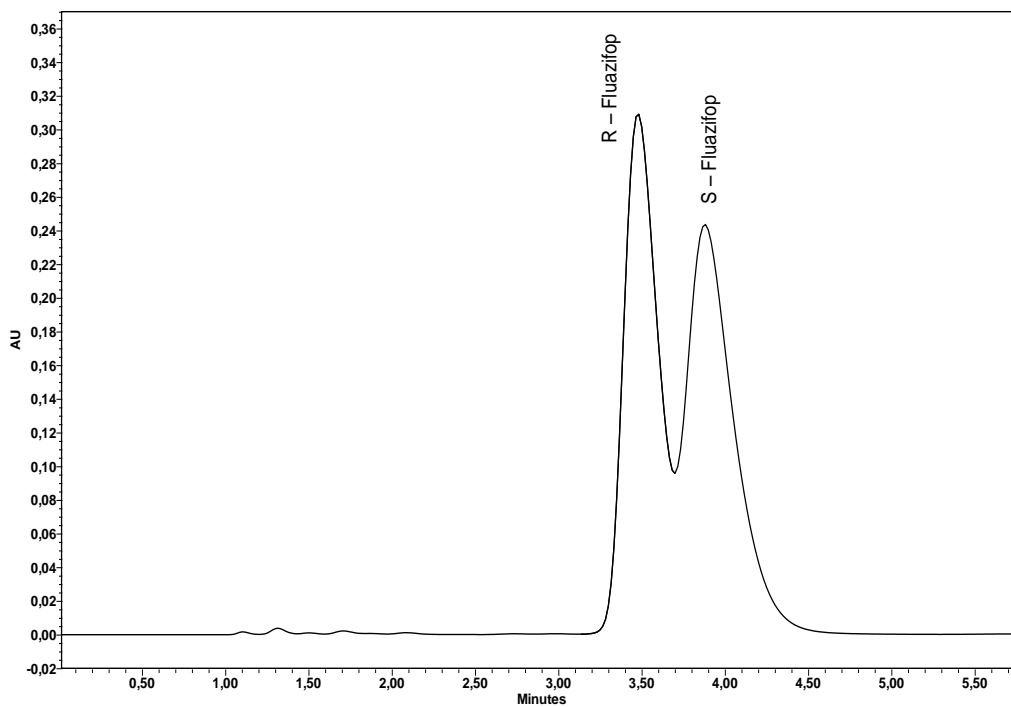


Graf 23: Graf závislosti rozlišení (R) enantiomerů herbicidů na koncentraci pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.



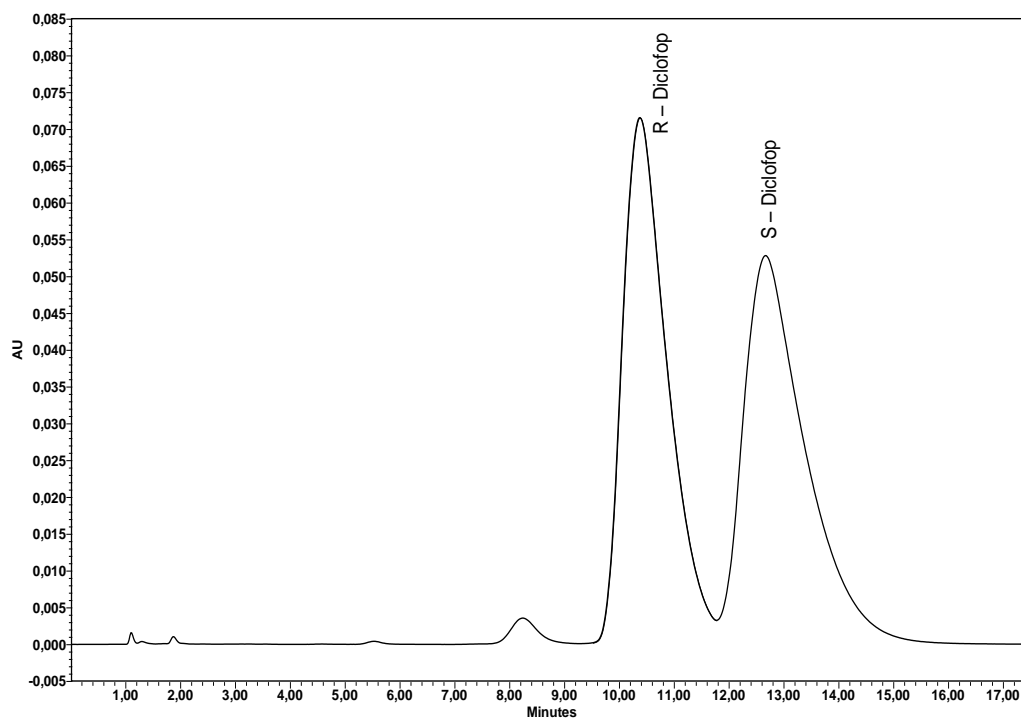
Graf 24: Graf závislosti účinnosti kolony pro R-enantiomery (N_R) herbicidů na koncentraci pufru $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.





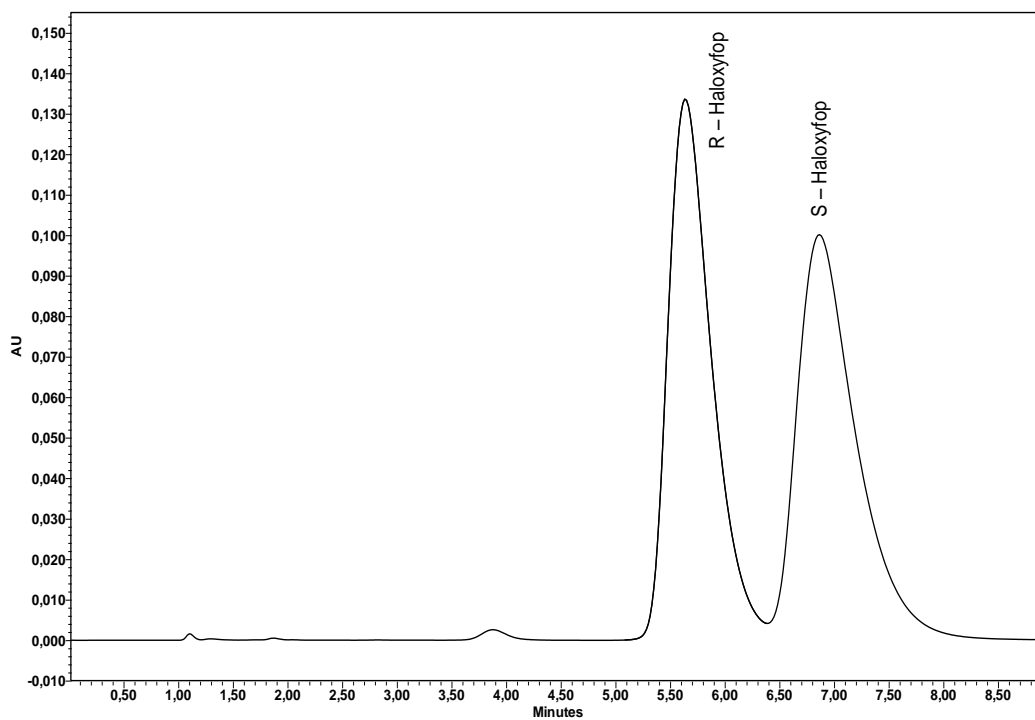
Obr. 14: Enantioseparace Fluazifopu.

Chromatografické podmínky: velikost kolony 150 x 4,6 mm I.D.; tlak plnění 40 MPa; mobilní fáze: 20 mM fosfátový pufr (pH 5,0)/methanol (45/55, v/v); průtoková rychlost 1 ml/min; UV při 254 nm; teplota 25 °C.



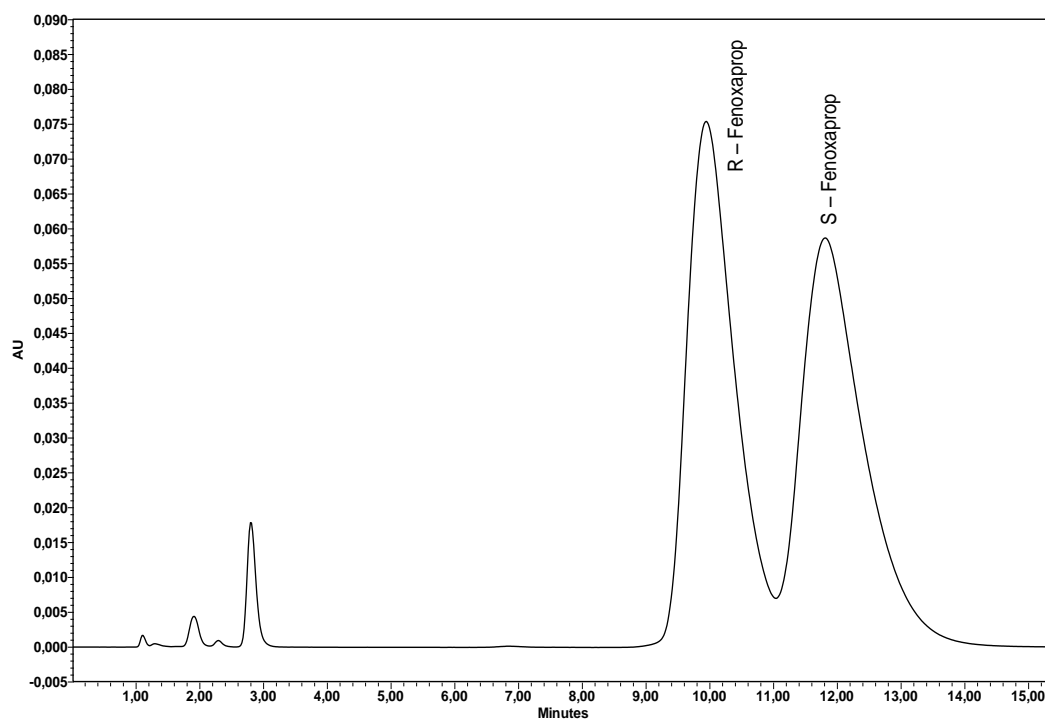
Obr. 15: Enantioseparace Diclofopu.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 14.



Obr. 16: Enantioseparace Haloxyfopu.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 14.



Obr. 17: Enantioseparace Fenoxapropu.

Chromatografické podmínky: viz obrázek 14.

5 ZÁVĚR

Zhodnocení enantioselektivních vlastností CSP na bázi 1-allyl-ergotaminu.

Z měřených závislostí enantioselektivity na pH, množství organického modifikátoru a iontové síle bylo určeno, že na rozpoznávání enantiomerů se nejspíše podílí elektrostatická interakce mezi karboxylovou skupinou analytů a protonizovaným dusíkem v pozici N6 na CSP. Enantiomerního rozpoznávání se pravděpodobně účastní vodíkové můstky mezi kyslíkem karboxylové skupiny analytů a různými atomy vodíku v molekule selektoru (např. NH v pozici 1'). Dále byla dokázána přítomnost nestereoselektivních hydrofobních a π - π interakcí.

Nejlepší separace enantiomerů dansylovaných aminokyselin bylo dosaženo v mobilní fázi složené z 20mM fosfátového pufru o pH 4,0 a acetonitrilu v poměru 45/55 % (v/v).

Nejlepší separace enantiomerů herbicidů bylo dosaženo v mobilní fázi složené z 20mM fosfátového pufru o pH 5,0, a methanolu v poměru 45/55 % (v/v).

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] Srkalová S.: Diplomová práce. PřF UK, Praha 2008.
- [2] Armstrong D.W., Reid G.L. Hilton M.L.: *Environ. Pollution* 79, 51 (1993).
- [3] Müller M.D., Buser H.: *Environ. Sci. Technol.* 29, pp. 2013 (1995).
- [4] Milne G.W.A.: *CRC Handbook of Pesticides*. Ann Boca Raton, Florida 1995.
- [5] Tesařová E., Armstrong D. W.: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl Z., ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 1998.
- [6] Vránská V.: Diplomová práce. PřF UK, Praha 2002.
- [7] Streblová E.: *Souhrnné texty z chemie*, II. díl. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2000.
- [8] Červinka O.: *Chem. Listy* 93, 294 (1999).
- [9] Štulík K., Ševčík J., a kol: *Analytické separační metody*, Karolinum, Praha 2005.
- [10] Honzátko A.: Diplomová práce. PřF UK, Praha 1999.
- [11] Eliel E.L.: *Stereochemie uhlíkatých sloučenin*, Academia, Praha (1969).
- [12] Ali I., Kumerer K., Aboul-Enein H.Y.: *Mechanistic Principles in Chiral Separations Using Liquid Chromatography and Cappillary Electrophoresis*. *Chromatographia* 63, 295-307 (2006).
- [13] Soini H., Riekkola M.L., Novotný M.: *J. Chromatogr.* 608, 37 (1992).
- [14] Tesařová E.: *Analýza chirálních sloučenin* (Tesařová E., ed.), kap. 4. Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
- [15] Tesařová E.: *Analýza chirálních sloučenin* (Tesařová E., ed.), kap. 2. Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
- [16] Crowther J.B., Dovey T.R., Dewey E.A., Henion J.D.: *Anal. Chem.* 56, 2921 (1984).
- [17] Kalíková K.: Diplomová práce, PřF UK, Praha 2005.
- [18] Armstrong D.W., DeMond W., Czech B.P.: *Anal. Chem.* 57, 484 (1985).
- [19] Allemark S., Anderson.: *Chromatografia* 31, 429 (1991).
- [20] Berthod A., Liu Y., Bagwill C., Armstrong D.W.: *J. Chromatogr.A*, 731, 123, (1996).
- [21] Lee S.H., Berthod A., Armstrong D.W.: *J. Chromatogr.* 603, 83-93 (1992).
- [22] Pirkle W.H.: *J. Am. Chem. Soc.* 88, 1837 (1966).
- [23] Mikeš F., Boshart G.: *J. Chromatogr.* 149, 455 (1978).
- [24] Řezáček Z., Zajel P.: *Ergot alkaloids*, Academia (1990).
- [25] Messina A., Girelli A.M, Flieger M., Sedmera P., Sinibaldi M. and Cvak L.: *Anal. Chem.* 68, 1191 (1996).

- [26] Jacobs W.A., Gould R.G.: *J. Biol. Chem.* 120, 2005 (1937).
- [27] Sinibaldi M., Flieger M., Cvak L., Messina A. and Pichini A.: *J. Chromatogr. A* 666, 471 (1994).
- [28] Flieger M., Wurst M., Shelby R.: *Folia Microbiol.* 42 (1), 3 – 33 (1997).
- [29] Řezáček Z.: *Biologické listy* 38, 213 (1973).
- [30] Dondi M., Flieger M., Olšovská J., Polcaro C.M., Sinibaldi M.: *J. Chromatogr. A*, 859, 133-142, (1999).
- [31] Padiglioni P., Polcaro C.M., Marchese S., Sinibaldi M., Flieger M.: *J. Chromatogr. A*, 756, 119-127, (1996).
- [32] Olšovská J.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 1994.
- [33] Ingelse B.A., Reijenga J.C., Flieger M., Everaerts F.M.: *J. Chromatogr. A* 791, 339 (1997).
- [34] Ingelse B.A., Flieger M., Reijenga J.C., Claessens H.A., Everaerts F.M.: *J. Chromatogr. A* 755, 251 (1996).
- [35] Ingelse B.A., Reijenga J.C., Claessens H.A., Everaerts F.M., Flieger M.: *J. High Resol. Chromatogr.* 19, 225 (1996).
- [36] Okuma E., Abe H.: *J. Chromatogr. B*, 660, 243 (1994).
- [37] Schell M.J., Cooper O.B., Snyder L.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2013 (1997).
- [38] Kolektiv pracovníků katedry biochemie: *Biochemie základní kurz*. UK, Praha 1995.
- [39] Karlson P.: *Základy biochemie*. Academia, Praha 1981.
- [40] Danakov V.A., Rogozhin S.V.: *J. Chromatogr.* 60, 280 (1971).
- [41] Yuasa S., Itok M., Shimada A.: *J. Chromatogr. Sci.* 22, 288 (1984).
- [42] Bomgren B., Allenmark S.: *Lig. Chromatogr.* 9, 667 (1986).
- [43] Hyun M.H., Jin J.S., Cho Y.J.: *Microchemical Journal* 70, 205 (2201).
- [44] Benešová T.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha 2002.
- [45] Koning W.A., Ischein D., Rubte T., Pfaffenberg B., Ludwig P., Huhnerfuss H.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 530 (1991).
- [46] Blessington B., Crabb N., O'Sullivan J.: *J. Chromatogr.* 396, 339 (1987).
- [47] Kobor F., Schomburg G.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 16, 693 (1993).
- [48] Armstrong D.W., Faulkner J.R.J., Han S.M.: *J. Chromatogr.* 452, 323 (1988).
- [49] Ward T.J., Armstrong D.W.: *J. Liq. Chromatogr.* 9, 407 (1986).
- [50] Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 735, 77 (1996).
- [51] Fanali S., Boček P.: *Electrophoresis* 11, 757 (1990).
- [52] Desiderio C., Polcaro C.M., Padiglioni P., Fanali S.: *J. Chromatogr. A* 781, 503 (1997).

[53] Hsieh Y.Z., Juany H.Y.: J. Chromatogr. A 745, 217 (1996).