

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



**Bc. Tereza Šlechtová**

Porovnání metod detekce a stanovení enantiomerů theaninu metodou  
HPLC

Comparison of methods for detection and determination of enantiomers  
of theanine in HPLC

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2012

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Prof. RNDr. Evy Tesařové, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne .....

.....

Tereza Šlechtová

## Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za odborné vedení diplomové práce a za podnětné rady při jejím zpracování. Velice děkuji také Mgr. Květě Kalíkové, Ph.D. za zaškolení v chromatografickém softwaru Breeze a za cenné rady a pomoc při laboratorním měření.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Pavlu Repkovi za pomoc s derivatizací aminokyselin a za zaškolení s fluorescenčním detektorem a Mgr. Petru Kozlíkovi za odbornou pomoc při používání hmotnostního detektoru.

Děkuji kolektivu v laboratoři za vytvoření příjemného pracovního prostředí a také své rodině a přátelům za podporu.

## **Abstrakt**

V této práci byly optimalizovány metody separace nederivatizovaných enantiomerů theaninu na dvou chirálních kolonách na bázi teikoplaninu a metody separace derivatizovaných enantiomerů pomocí 9-fluorenylmethoxykarbonyl chloridu a dansylchloridu. U všech metod byly za optimalizovaných podmínek zjištěny limity detekce a stanovitelnosti. Za optimalizovaných podmínek byl také zjišťován obsah enantiomerů theaninu ve vybraném zeleném čaji a potravinovém doplňku na bázi L-theaninu.

## **Abstract**

This thesis focused on optimization of separation methods for underivatized theanine enantiomers on two teicoplanin-based chiral stationary phases and separation methods for enantiomers derivatized by 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride and dansylchloride. Using these optimized conditions the limits of detection and quantification were calculated. Under optimized conditions were also investigated the contents of theanine enantiomers in green tea and in selected dietary supplement containing L-theanine.

## **Klíčová slova**

HPLC

Derivatizace

9-Fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid

Dansylchlorid

Theanin

## **Keywords**

HPLC

Derivatization

9-Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride

Dansylchloride

Theanine

## Seznam zkratek a symbolů

$\alpha_{1,2}$	separační faktor
AC	aceton
ACN	acetonitril
ADAM	adamantanamin
AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát
CSP	chirální stacionární fáze
DAD	detektor s diodovým polem
Dns-Cl	5-dimethylamino-1-naftalen sulfonyl chlorid
FLD	fluorescenční detekce
FMOC-Cl	9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid
FMOC-OH	produkt hydrolýzy 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridu
HEPA	heptylamin
HPLC	vyskoučinná kapalinová chromatografie
$k$	retenční faktor
MA	makrocyclická antibiotika
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometr
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
PITC	fenyliothiokyanát
$R_{1,2}$	rozlišení
SDS	dodecylsulfát sodný
TEA	triethylamin
TEAA	triethylaminoctanový pufr
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
$t_R$	retenční čas
UV/VIS	detektor pro ultrafialovou a viditelnou oblast spektra

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	6
1. Úvod .....	9
2. Teoretická část .....	10
2.1 Chiralita .....	10
2.2 Chirální separace v HPLC .....	11
2.2.1 Detektory používané v HPLC .....	12
2.2.2 Chirální stacionární fáze .....	13
2.2.2.1 Makrocyclická antibiotika .....	14
2.2.2.2 Teikoplanin .....	15
2.2.3 Derivatizace .....	16
2.2.3.1 9-Fluorenylmethoxykarbonylchlorid .....	20
2.2.3.2 Dansylchlorid .....	23
2.3 Aminokyseliny .....	26
2.4 Čaj .....	28
2.5 Theanin .....	33
3. Experimentální část .....	35
3.1 Použité chemikálie .....	35
3.2 Přístroje a pomůcky .....	36
3.3 Mobilní fáze a podmínky měření .....	37
3.4 Příprava a uchování vzorků a činidel .....	38
3.5 Zpracování naměřených dat .....	40
3.6 Výsledky a diskuze .....	41
3.6.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin .....	41
3.6.1.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic TAG .....	41
3.6.1.1.1 Kalibrační závislost L-theaninu na koloně Chirobiotic TAG .....	43
3.6.1.2 Separace nederivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic T .....	44
3.6.1.2.1 Separace směsi DL-aminokyselin .....	46

3.6.1.2.2 Kalibrační závislost L-theaninu na koloně Chirobiotic T .....	48
3.6.1.3 Porovnání kolon .....	49
3.6.2 Separace a kvantifikace derivatizovaných aminokyselin .....	50
3.6.2.1 Derivatizace aminokyselin pomocí FMOC-Cl .....	50
3.6.2.1.1 Optimalizace separace aminokyselin derivatizovaných FMOC-Cl .....	50
3.6.2.1.2 Extrakce pentanem .....	54
3.6.2.1.3 Kalibrační závislost FMOC-DL-theaninu .....	54
3.6.2.2 Derivatizace aminokyselin dansylchloridem .....	56
3.6.2.2.1 Optimalizace separace dansylovaných aminokyselin	56
3.6.2.2.2 Kalibrační závislost Dns-DL-theaninu .....	60
3.6.2.3 Porovnání derivatizačních činidel .....	62
3.6.3 Analýza potravinového doplňku obsahujícího L-theanin .....	64
3.6.4 Analýza zeleného čaje .....	68
3.6.4.1 Důkaz přítomnosti theaninu v čaji .....	68
3.6.4.2 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji optimalizovanými metodami bez a za použití derivatizace .....	71
3.6.4.2.1 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji bez derivatizace .....	71
3.6.4.2.2 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji po derivatizaci FMOC-Cl .....	73
3.6.4.2.3 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji po derivatizaci dansylchloridem .....	75
3.6.4.2.4 SPE prekoncentrace theaninu v čaji .....	76
4. Závěr .....	77
5. Použitá literatura .....	79



# 1. Úvod

V dnešní době je průmyslově vyráběno mnoho chirálních látek, které nacházejí uplatnění například jako léčiva, pesticidy nebo potravinová aditiva. Jako důsledek rozdílného prostorového uspořádání je časté, že jednotlivé enantiomery vykazují různé chemické nebo fyzikální vlastnosti. Pro zjištění chování jednotlivých enantiomerů v životním prostředí a organismech byly vyvinuty a stále se vypracovávají nové vysoce účinné a citlivé metody analýzy.

Mezi chirální látky se řadí i aminokyseliny, které mohou, ale také nemusí tvořit proteiny v živých organismech. Jednou z neproteinogenních aminokyselin je theanin, látka vyskytující se v lístcích čajovníku, která je zodpovědná za některé zdraví prospěšné účinky čaje. Jako naprostá většina aminokyselin se také theanin vyskytuje ve formě dvou enantiomerů. Metabolická dráha L-theaninu je již poměrně detailně prozkoumána, zatímco o osudu jeho D-analogu v lidském těle se toho ještě moc neví.

Je normální, že se v lístcích čajovníku vyskytuje malá příměs D-theaninu, který se pak uvolňuje do čaje, ale toto množství je obvykle velmi malé. Nezvykle vysoké množství D-theaninu však může signalizovat nevhodné zacházení, např. vystavování vysokým teplotám, nevhodnému pH nebo radiaci.

Dále se s theaninem můžeme setkat v různých potravinových doplncích, které jsou vyráběny právě kvůli jeho pozitivním účinkům na zdraví jako je snižování krevního tlaku, zmírňování nežádoucích efektů kofeinu, působení proti rakovině, zlepšování paměti a odbourávání stresu. Byla provedena studie, kde bylo analyzováno několik takovýchto potravinových doplňků pocházejících z Číny, Kanady a USA, které měly obsahovat L-theanin. Místo toho však většina z nich obsahovala racemát enantiomerů. Toto zjištění je velice důležité, neboť metabolická dráha D-theaninu ještě není zcela známa a není jisté, jestli není ve větším množství zdraví nebezpečný.

Na popud této studie se předkládaná práce zabývá optimalizací separace enantiomerů theaninu metodou HPLC s použitím chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu. Zvláštní pozornost je věnována možnostem zvýšení citlivosti detekce derivatizací. Vypracované metody byly použity k analýze potravinového doplňku obsahujícího theanin a výluhů ze zeleného čaje.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Chiralita

Chiralita je prostorově geometrická vlastnost molekuly. Tento pojem popisuje skutečnost, že se mnohé přírodní i synteticky vyrobené látky vyskytují ve dvojicích izomerů o prostorových strukturách, které se chovají jako zrcadlové obrazy. <sup>1</sup> Dva chirální objekty, které jsou ve vzájemném vztahu vzor a zrcadlový obraz pak nazýváme enantiomery. <sup>2</sup>

Chirální molekuly ve své struktuře obsahují tetraedrické atomy, nejčastěji uhlíkové, ale může to být také dusík, fosfor, křemík nebo síra, ke kterým jsou navázány čtyři různé substituenty. <sup>3</sup> Takový atom uhlíku se nazývá asymetrický, neboli chirální. <sup>2</sup>

Enantiomery mají stejné chemické a fyzikální vlastnosti, ale liší se směrem stáčení roviny polarizovaného světla definované vlnové délky, měřené nejčastěji při sodíkové čáře. Pokud oba enantiomery smísíme ve stejném poměru, vzniká racemát, který je jako celek opticky neaktivní. <sup>4</sup>

Již v polovině 19. století <sup>5</sup> bylo zjištěno, že jednotlivé enantiomery mají vlivem odlišné konformace rozdílné biologické vlastnosti, chování, a samozřejmě také toxicitu. <sup>6</sup> Větší důraz na výzkum rozdílného chování enantiomerů se však začal klást až v druhé polovině 20. století při vývoji metod pro separaci a identifikaci enantiomerů. <sup>5</sup>

Protože živé organismy představují chirální prostředí, jsou schopny jednotlivé enantiomery rozlišovat, např. v mnohých stereoselektivních metabolických cestách. Proto je nutné zabývat se chirálními a prochirálními látkami podrobně nejen v lidském těle, ale také v tělech ostatních organismů a v životním prostředí. <sup>5</sup> Mezi tyto látky řadíme léčiva, chemikálie i sloučeniny používané v potravinářském průmyslu a zemědělství. <sup>6</sup>

Jako příklad odlišných účinků jednotlivých enantiomerů lze uvést ketoprofen, léčivou látku používanou na bolesti svalů a kloubů. Účinnou látkou je S-enantiomer, zatímco R-ketoprofen je sám o sobě neúčinný. Tento rozdíl mezi enantiomery je dán specifickými požadavky vazebného místa cílových enzymů na konformaci. Důsledkem je preference S-enantiomeru. R-ketoprofen však není zcela bez účinku. V lidském těle existují enzymy, které jsou schopny přeměnit cca 10% R-enantiomeru na jeho S-analog. <sup>7</sup>

Podobné odlišné účinky enantiomerů byly objeveny také u hojně používaného ibuprofenu, u kterého má protizánětlivé účinky opět pouze S-enantiomer.<sup>8</sup>

U těchto dvou léčiv je sice účinný pouze jeden enantiomer, ale jeho analog nevykazuje žádné negativní účinky na organismus. To se však nedá říci u mnoha dalších léčiv. Jako příklad lze uvést ethambutol a thalidomid. Zatímco S,S-ethambutol působí jako tuberkulostatikum, R,R-enantiomer způsobuje oslepnutí. Účinky mnohem známějšího thalidomidu jsou ještě horší, R-enantiomer má sedativní účinky, zatímco S-thalidomid je silně teratogenní.<sup>8</sup>

Z těchto několika málo příkladů je jasné, že jednotlivé enantiomery léčiv se mohou lišit v účinnosti, toxicitě a farmakologických účincích. Proto současné požadavky na čistotu farmaceutických přípravků zahrnují i studii na enantiomerní čistotu, respektive znalost účinků obou enantiomerů, pokud je přípravek používán ve formě racemátu. Uvádí se, že v současné době je z 50 % chirálních léčiv na trhu asi 75 % v racemické podobě a pouze 25 % je tvořeno jedním enantiomerem. Lze předpokládat, že bude docházet stále více k posunu ve prospěch enantiomerně čistých sloučenin.<sup>5</sup>

## 2.2 Chirální separace v HPLC

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejčastěji používaných metod pro separaci chirálních sloučenin. Používá se pro analýzu téměř 90 % sledovaných chirálních látek, především léčiv.<sup>9</sup>

Chirální separace je proces, kdy jsou od sebe oddělovány molekuly jedné látky s různým prostorovým uspořádáním. Existují dva způsoby, jak od sebe tyto látky rozdělit, a to přímá a nepřímá metoda.

Nepřímá metoda je založena na reakci enantiomerů analytu s derivatizačním činidlem za vzniku stabilních diastereomerních párů. Separaci takto vzniklých látek lze uskutečnit na achirální stacionární fázi. Přímá metoda je založena na interakcích enantiomerů s chirální stacionární fází (CSP) nebo s chirálním aditivem přítomným v mobilní fázi, kdy vznikají nestabilní diastereomerní páry. Chirální selektor pak přednostně interaguje s jedním z enantiomerů, čímž ho více zadržuje v koloně a separuje ho tak od jeho analogu.<sup>9, 10</sup>

Nejčastěji se v HPLC používá přímá separační metoda za využití CSP. Výhody spočívají v rychlosti, snadné izolaci čistých enantiomerů, snadném určení poměru

enantiomerů pomocí ploch píků a nepotřebě chirální předúpravy vzorku. Nevýhodou představuje vysoká cena CSP.<sup>11, 12</sup>

Obrovskou výhodou spojenou s nepřímou separací je zvýšení citlivosti detekce vlivem derivatizace a nižší náklady spojené s využitím achirální stacionární fáze. Nevýhody této metody spočívají v potřebě vysoké optické čistoty derivatizačního činidla a možnosti racemizace během derivatizačního procesu.<sup>10, 11, 12</sup>

Velký význam pro analýzu enantiomerů má také výběr detektoru. Většina chirálních látek se v životním prostředí vyskytuje ve velmi malých koncentracích, proto je nutné pečlivě vybrat vhodný způsob detekce s ohledem na citlivost a destruktivní charakter detektoru, popř. také na kompatibilitu s gradientovou elucí.

### **2.2.1 Detektory používané v HPLC**

Detektory používané v HPLC monitorují charakteristické vlastnosti, např. absorbanci v UV oblasti, v závislosti na koncentraci nebo množství eluujících analytů. Detektory mohou být univerzální, selektivní nebo specifické pro určitou skupinu analytů.<sup>13</sup> Univerzální detektory reagují na vlastnosti systému jako celku, selektivní detektor pouze na určitou vlastnost analytu a specifické jsou určeny pouze pro úzce ohraničenou skupinu látek.<sup>14</sup> Porovnání citlivosti vybraných detektorů je znázorněno v Tabulce 1.

Nejběžněji jsou používány detektory spektrofotometrické, které sledují absorbanci látek ve viditelné a ultrafialové oblasti (UV/VIS) spektra.<sup>15</sup> Používají se při více než 80 % analýz<sup>14</sup> a jsou prakticky univerzální pro stanovení organických látek. Vykazují velmi široký lineární dynamický rozsah a nízké meze detekce.<sup>15</sup> Obvykle snímají pouze jednu nebo dvě měnitelné vlnové délky, ale stále více se používají detektory s diodovým polem (DAD), které jsou schopny monitorovat celé spektrum v reálném čase bez přerušení separace, aniž by docházelo k poklesu citlivosti.<sup>16</sup>

Pro látky vykazující fluorescenci je výhodné použít fluorimetrický detektor, který umožňuje dosáhnout velmi nízkých mezí detekce.<sup>13, 15</sup> Komplikací může být fakt, že většina látek nemá fluorescenční vlastnosti, proto je nutné je derivatizovat a vnést tak do molekuly analytu fluorescenční skupinu.<sup>17</sup> Vždy je při použití tohoto detektoru nutné dbát na to, aby mobilní fáze neobsahovala zhášeče fluorescence.<sup>14</sup>

Alternativně je možné použít elektrochemické detektory, dále např. refraktometrické, chemiluminiscenční, radioaktivní nebo nukleární magnetickou rezonanci.<sup>13</sup>

Stále častěji se v HPLC používají hmotnostní (MS) detektory, které umožňují přímou identifikaci separovaných látek na základě získaných hmotnostních spekter.<sup>15</sup> Při této metodě dochází k převedení molekul analytů na nabitě částice, k jejich rozdělení podle poměru hmotnosti a náboje a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Metoda se vyznačuje velmi nízkými limity detekce a velkou citlivostí, výhodou je také velmi malá spotřeba vzorku.<sup>18</sup>

**Tab. 1** Citlivost vybraných detektorů používaných v HPLC<sup>13</sup>

<b>Detektor</b>	<b>Citlivost</b>
<b>UV/VIS</b>	ng-pg
<b>DAD</b>	ng-pg
<b>MS (MS/MS)</b>	ng-pg (pg-fg)
<b>Fluorimetrický</b>	pg-fg
<b>Elektrochemický</b>	pg
<b>Refraktometrický</b>	μg

### **2.2.2 Chirální stacionární fáze**

Jak již bylo zmíněno výše, při použití CSP dochází k tvorbě diastereomerních komplexů odlišné stability. Tyto komplexy vznikají navázáním enantiomerů na receptor, v tomto případě CSP, a pak podle síly vzniklé vazby a stability komplexu dochází k charakteristickému rozdílnému zadržování jednotlivých enantiomerů.<sup>10</sup>

Jedním z uznávaných modelů popisu chirální separace molekul je model třibodové interakce, který byl poprvé publikován roku 1933 Eassonem a Stedmanem.<sup>19</sup> Dokázali jím, že různé farmakologické vlastnosti léčiv jsou způsobeny rozdílnou prostorovou vazbou na povrch receptoru, protože vlivem jiného prostorového uspořádání látky docházelo k diskriminaci enantiomeru, který se nemohl navázat na receptor všemi vazbami.<sup>20</sup> Tento model byl postupně vylepšován a konečnou podobu mu dali

Lochmuller a Souter.<sup>21</sup> Aby došlo k rozlišení enantiomerů, je podle jejich modelu nutné, aby existovaly alespoň tři interakce mezi receptorem a jedním z enantiomerů, přičemž alespoň jedna z těchto interakcí musí stereospecificky spojovat chirální centra receptoru a enantiomeru.<sup>20</sup>

První zdařilá separace enantiomerů v HPLC byla popsána Davankovem začátkem sedmdesátých let minulého století a první komerčně dostupná CSP byla uvedena na trh roku 1981. V současné době je k dispozici široká škála různých CSP od řady výrobců. Nejvýhodnější jsou takové fáze, které umožňují dělení celé řady strukturně odlišných chirálních analytů, ale pro konkrétní účely se dobře hodí i tzv. na míru šité CSP, které umožňují dělit pouze danou dvojici enantiomerů nebo velmi omezenou skupinu podobných analytů.<sup>5</sup>

Dnes jsou nejvíce používanými typy CSP proteinové, cyklodextrinové, polysacharidové, Pirklovy stacionární fáze a makrocyclická antibiotika.<sup>10</sup>

### 2.2.2.1 Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika (MA) jsou přírodní látky vznikající jako fermentační produkty bakterií<sup>11</sup> a jsou používány k léčbě onemocnění způsobených grampozitivními i gramnegativními bakteriemi.<sup>22</sup> Jsou považována za velmi účinné chirální separátory, protože mají řadu chirálních center a mnoho funkčních skupin, což jim umožňuje různé interakce s různými analyty<sup>23</sup>, např. vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce, inkluze, sterické interakce, dipólové interakce a jejich různé kombinace.<sup>11, 24, 25</sup>

Vzhledem k tomu, že MA mají mnoho hydrofilních a ionizovatelných skupin, jsou dobře rozpustná ve vodě. Ionizovatelné skupiny také umožňují interakce s ionizovatelnými analyty, čímž přispívají k rozpoznávání jednotlivých enantiomerů.<sup>22, 23</sup>

Vzhledem k větší enantioselektivitě se v dnešní době nejvíce používají CSP na bázi makrocyclických glykopeptidů, a to Chirobiotic V/V2 (vankomycin), Chirobiotic T/T2 (teikoplanin), Chirobiotic TAG (teikoplanin aglykon), Chirobiotic R (ristocetin A) a Chirobiotic A (avoparcin).<sup>23</sup> Svou strukturou tvoří tzv. aglykonový koš, který je sestavený ze tří nebo čtyř spojených makrocyclických kruhů a heptapeptidového řetězce.<sup>22</sup> Cukerné skupiny navázané na aglykonový koš mohou rotovat a různě se orientovat v prostoru. Proto avoparcin, ristocetin a teikoplanin nejsou čisté látky, ale existují ve směsích o různém izomerním složení. Avoparcin a ristocetin se běžně

vyskytují jako směs dvou izomerů, teikoplanin dokonce vytváří směs pěti izomerů, které se liší počtem uhlíků a funkčních skupin na postranním řetězci.<sup>23</sup> Teikoplanin je také unikátní tím, že má na glukopyranosylovou část navázán hydrofobní C<sub>11</sub> řetězec umožňující tvorbu micel v roztoku a je zodpovědný za specifické farmakologické vlastnosti.<sup>26</sup>

Selektivita MA je ovlivněna složením mobilní fáze, pH, organickým modifikátorem a teplotou. Vždy je potřeba udržovat pH pufru v rozmezí 2,8 – 7,0 z důvodu omezené stability silikagelového nosiče a vazby MA na něj.<sup>6</sup> Aby se dosáhlo co možná největší enantioselektivity, lze MA CSP používat ve třech elučních módech, a to v reverzním, normálním a s polárně organickou mobilní fází.<sup>23, 25</sup>

MA našla široké uplatnění při separaci enantiomerů aminokyselin. Obecně u teikoplaninu, teikoplaninu aglykonu a ristocetinu A platí, že retence D-enantiomerů přírodních aminokyselin je delší, zatímco u β-aminokyselin, uměle vytvořených a cyklických aminokyselin je eluční pořadí obrácené, tzn. D-enantiomery eluují před svými L-analogy.<sup>22</sup>

### 2.2.2.2 Teikoplanin

Teikoplanin (Obr. 1A) je glykopeptidové antibiotikum hojně využívané k chirálním separacím. Jeho aglykonový koš je tvořen čtyřmi spojenými kruhy složenými ze sedmi aromatických kruhů. Na ně jsou navázány tři monosacharidové struktury, D-manósa a dva D-glukosaminy.<sup>22, 25</sup>

Vzhledem k velkému množství chirálních center, které teikoplanin obsahuje, a možnosti zachycovat analyty mnoha různými interakcemi, lze těmito CSP separovat velké množství chirálních látek.<sup>6</sup>

Nejpoužívanější komerčně dostupné CSP na bázi teikoplaninu jsou Chirobiotic T, T2, a TAG. Teikoplaninové CSP T a T2 jsou analogické, pouze vyrobené jiným postupem. Díky tomu se liší pokrytím chirálním selektorem, což jim dává rozdílné vlastnosti při separacích.<sup>6</sup> TAG (Obr. 1B) je modifikovaná forma, která má stejný aglykonový koš, ale nemá tři cukerné struktury, a tudíž ani uhlovodíkový řetězec, který byl k jednomu z nich připojený. Mizí tak stericke efekty těchto částí a molekula se stává lépe přístupnou k interakcím. Volné místo po odstraněných sacharidových strukturách nahrazují tři OH skupiny.<sup>22, 25</sup> TAG má díky rozdílům ve struktuře oproti teikoplaninu

větší schopnost zadržovat analyty, proto jeho použití vede ke zvýšení retence<sup>5</sup>, které je u aminokyselin často doprovázeno také zvýšením hodnoty chirálního rozlišení<sup>5, 22</sup>, protože mají lepší přístup k vazebným místům.<sup>22</sup> Existuje však také mnoho látek, které se daleko lépe separují na nemodifikovaném teikoplaninu (nebo pouze na něm), protože právě cukerné struktury pomáhají k jejich zachycování.<sup>22</sup>

Bylo zjištěno, že TAG se oproti teikoplaninu T vyznačuje větší selektivitou, ale občas také menší separační účinností pro některé aminokyseliny a jejich deriváty. Proto byl připraven methylovaný teikoplanin aglykon, u kterého jsou blokovány skupiny umožňující vodíkové vazby, což má v některých případech za následek zvýšení účinnosti separace.<sup>22, 25</sup>

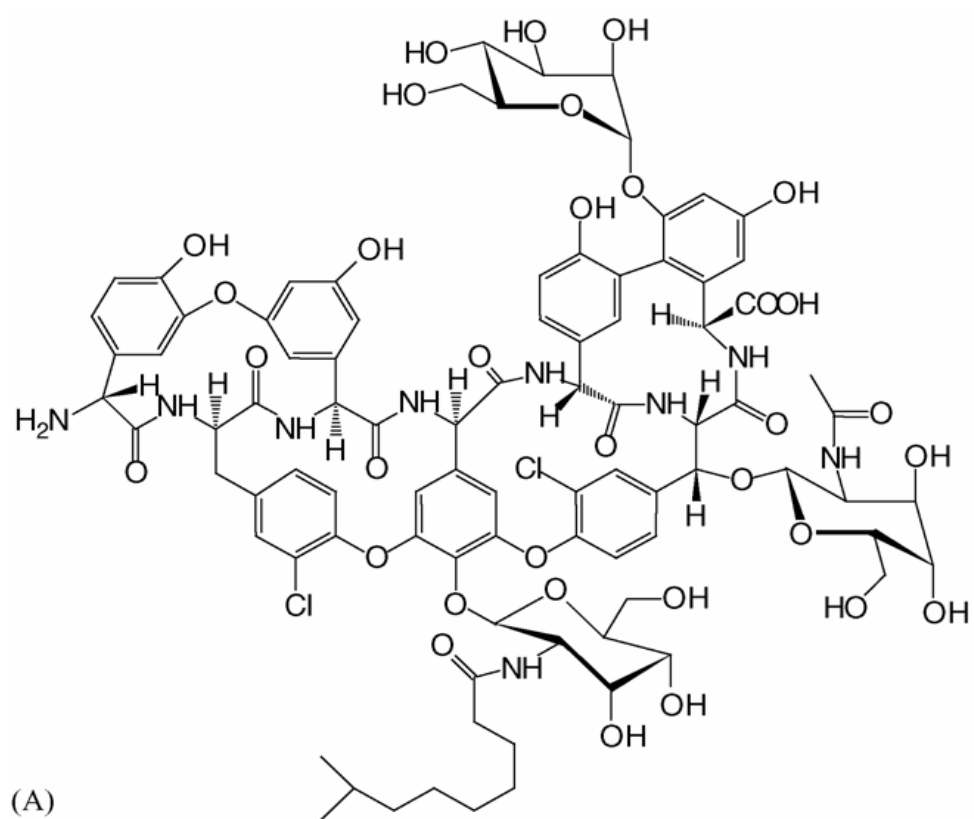
### **2.2.3 Derivatizace**

Derivatizace je proces, který vede k tvorbě kovalentně vázaných struktur. V případě nepřímé separace se jedná o diastereoizomery. Funkční skupiny, na kterých probíhá derivatizace nejčastěji, jsou aminoskupiny, karboxylové a hydroxylové skupiny. Derivatizace však může být také použita pouze ke zvýšení citlivosti detekce, příkladem může být vnesení fluorescenční skupiny do struktury analytu.<sup>5</sup>

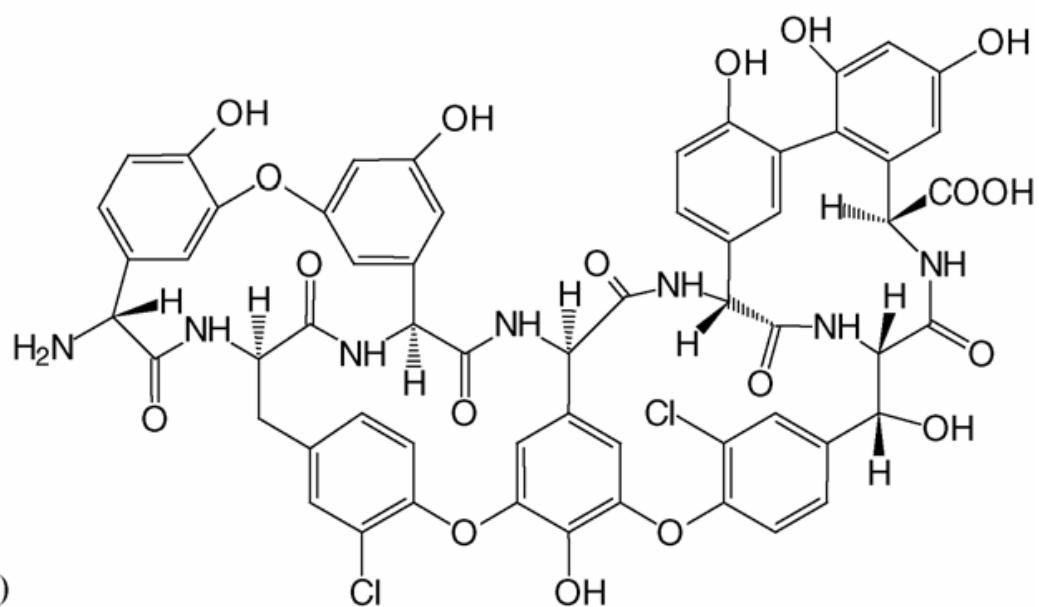
Derivatizační techniky lze rozdělit do tří kategorií podle místa derivatizace. Nejčastější je předkolonová derivatizace, kdy jsou analyty derivatizovány před vstupem do kolony. Postkolonová derivatizace se uplatnila např. s *o*-ftalaldehydem, ale příliš se neujala, protože při ní dochází k rozšiřování chromatografické zóny a snížení účinnosti separace. Třetím a nejméně používaným způsobem je derivatizace probíhající přímo na koloně.<sup>27</sup>

Způsob derivatizace může ovlivňovat eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy) a také požadavky na deriváty a derivatizační reakce jsou odlišné.<sup>17, 27</sup> Pro porovnání jsou v Tabulce 2 uvedeny požadavky na před- a postkolonovou derivatizaci.





(A)



(B)

**Obr. 1** Struktury A) teikoplaninu a B) teikoplaninu aglykonu

Dále můžeme derivatizační reakce rozdělit podle způsobu detekce. Nejčastěji probíhá detekce v ultrafialové a viditelné oblasti spektra nebo fluorimetricky. Účelem fluorimetrické detekce je zavést do molekuly skupinu, která vykazuje fluorescenční vlastnosti. Vzniklé deriváty pak vykazují detekční limity až o tři řády nižší než deriváty detekované v ultrafialové a viditelné oblasti spektra.<sup>28</sup> Při derivatizaci fluoreskujícím činidlem je velice výhodné, pokud činidlo samo nelze fluorimetricky detekovat. Odpadá pak možnost interference činidla s analyty, popř. nutnost zbavit se jeho přebytku.<sup>29</sup>

Mezi nejčastěji používaná derivatizační činidla ke stanovení aminokyselin patří *o*-ftalaldehyd (OPA), ninhydrin, dansyl chlorid (Dns-Cl), dabsyl chlorid (Dbs-Cl), fenylizothiokyanát (PITC), 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát (AQC) a 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl).<sup>10, 27</sup> V Tabulce 3 jsou uvedeny některé základní charakteristiky těchto derivatizačních činidel.

**Tab. 2** Požadavky na deriváty pro před- a postkolonovou derivatizaci <sup>28</sup>

<b>Předkolonová derivatizace</b>	<b>Postkolonová derivatizace</b>
derivát musí být chemické individuum a měl by být dostatečně stabilní	reakce nemusí poskytovat jednoznačné chemické individuum
reakce musí probíhat kvantitativně	reakce nemusí probíhat kvantitativně
reakce nemusí probíhat rychle	reakce musí probíhat rychle
reakce by měla být selektivní a bez vedlejších produktů	reakce může být neselektivní, vedlejší produkty nejsou na závadu
reakce by měla probíhat za mírných reakčních podmínek (pH, teplota)	reakce může probíhat za extrémních podmínek (pH, teplota)
při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být dobře separovatelné od svých produktů na koloně	používá se nadbytek reakčního činidla, čímž dochází ke zředování mobilní fáze

**Tab. 3** Porovnání nejpoužívanějších derivatizačních činidel pro aminokyseliny <sup>30</sup>

Charakteristika	<b>OPA</b>	<b>FMOC-Cl</b>	<b>Ninhydrin</b>	<b>Dns-Cl</b>	<b>AQC</b>	<b>PITC</b>
Detekce	FLD	FLD/UV	UV	UV/FLD	FLD	UV
Citlivost	fmol	fmol/pmol	mmol	pmol (nmol)	fmol	pmol
Stabilita derivátu	špatná	dobrá	--	dobrá	dobrá	střední
Rychlost derivatizace	rychlá	rychlá	pomalá	pomalá	rychlá	střední
Sekundární aminokyseliny	ne	ano	ano	ano	ano	ano
Interference reagentu	ne	ano	ne	ano	ano	ano
Interference matrice	malá	střední	ne	malá	ne	vysoká

*Vysvětlivky:* AQC – 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát; Dns-Cl – dansylchlorid; FMOC-Cl – 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid; OPA – *o*-ftalaldehyd; PITC – fenylizothiokyanát; FLD – fluorescenční detekce; UV – detekce v ultrafialové oblasti spektra

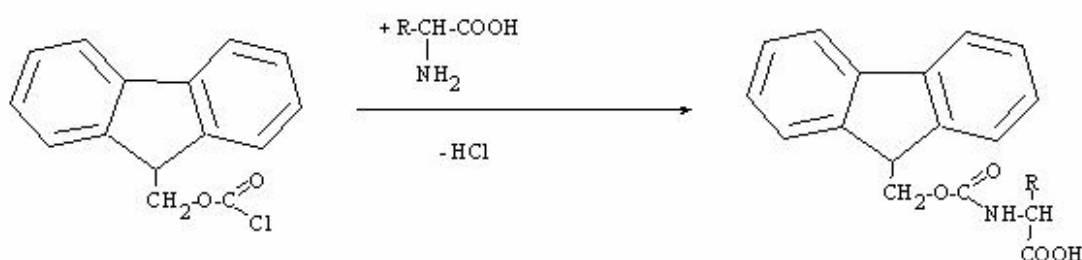
### 2.2.3.1 9-Fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid

9-Fluorenylmethyloxycarbonyl chlorid (FMOC-Cl) je derivatizační činidlo používané pro aminy a aminokyseliny. Poprvé byl představen roku 1972 Carpinem a Hanem při peptidové syntéze jako ochranná skupina pro primární a sekundární aminy.<sup>31</sup> FMOC-Cl byl pak hojně používán v organické chemii, protože je stabilní vůči kyselinám a hydrolyze, ale štěpí se působením organických bází.

S aminokyselinami reaguje podle schématu (Obr. 2)<sup>28</sup> za vzniku fluoreskujících derivátů s excitačním maximem při 263 nm a emisním maximem 313 nm a používá se výhradně k derivatizaci před kolonou.<sup>32</sup> Je možná také detekce v UV oblasti, a to při 262 nm, ale detekce je méně citlivá.<sup>33</sup> Reakce s aminokyselinami probíhá v prostředí acetonu nebo acetonitrilu<sup>34</sup>, výjimečně v tetrahydrofuranu.<sup>35</sup>

Výhody tohoto činidla představují rychlost reakce, průběh za pokojové teploty a především možnost derivatizace jak primárních, tak i sekundárních aminokyselin.<sup>36</sup>

Nevýhodou použití této látky je, že se používá ve velkém nadbytku. Nadbytek derivatizačního činidla a produkt jeho hydrolyzy, FMOC-OH, lze odstranit extrakcí organickými rozpouštědly, např. hexanem nebo pentanem, ale to může prodlužovat dobu analýzy nebo způsobit částečnou ztrátu vzniklých derivátů aminokyselin až o 25-50%.<sup>34</sup> Proto se také občas ke zreagované směsi přidává amin, např. heptylamín nebo adamantanamin, který reaguje s přebytkem činidla a nezpůsobuje ztrátu analytů<sup>34, 37</sup>, ale ve směsi pak stále zůstává FMOC-OH.<sup>38</sup> V Tabulce 4 jsou uvedena některá předchozí stavování aminokyselin derivatizovaných FMOC-Cl, včetně podmínek derivatizace a odstranění přebytku činidla.



**Obr. 2** Schéma reakce FMOC-Cl s aminokyselinami<sup>28</sup>

**Tab. 4** Tabulka stanovení aminokyselin derivatizovaných FMOC-Cl

Pufr	Rozpouštědlo	Doba reakce	Odstranění činidla	Kolona	Mobilní fáze	Detekce [nm]	Citace
0,2 M hydrogen-uhličitan sodný, pH 9	ACN	20 min		Chirobiotic T, T2, TAG, 5 µm, 250 x 4,6 mm	Izokratická eluce: MeOH a 0,5 % TEAA o pH 6 40:60	UV 262 FLD 254/314	3
0,2 M tetraboritan sodný, pH 7,7	AC	40 s	pentan	Shandon ODS Hypersil, 3µm, 125 x 4,6 mm	Gradientová eluce: (A) ACN (B) MeOH (C) destilovaná H <sub>2</sub> O, TEA, CH <sub>3</sub> COOH, pH upraveno pomocí NaOH	FLD 260/310	31
0,4 M tetraboritan sodný, pH 8 a 9	ACN nebo AC	20 min	ADAM HEPA	Hypersil ODS, 5 µm, 150 x 4,6 mm s Hypersil ODS, 5 µm, 30 x 4,6 mm předkolonkou 50 °C	Gradientová eluce: (A) 0,05 M CH <sub>3</sub> COONa o pH 7,2 (B) 23:22 0,10 M CH <sub>3</sub> COONa a ACN o pH 7,2 (C) ACN	DAD 262 FLD 254/313	34
0,2 M borátový pufr, pH 8,5	AC	3 min	HEPA	250-4 Supersphere 60 RP-8 40 °C	Gradientová eluce: (A) 78 % 0,1 M CH <sub>3</sub> COONa, upraveno NaOH na pH 4,4 a 22 % ACN (B) ACN	FLD 265/315	37
0,1 M tetraboritan sodný, pH 8 a 11,4	AC	pH 8: 10 min pH 11,4: 40 min	pentan	Micropak ODS-80 TM, 5 µm, 4,6 x 150 mm 40 °C	Gradientová eluce: (A) 20 mM kys. citronová, 5 mM [(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N]Cl a 0,01 % NaN <sub>3</sub> , upraveno na pH 2,85 20 mM CH <sub>3</sub> COONa obsahující 5 mM [(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N]Cl a 0,01 % NaN <sub>3</sub> (B) 80 % 20 mM CH <sub>3</sub> COONa, 5 mM [(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> N]Cl a 0,01 % NaN <sub>3</sub> (upraveno na pH 4,5 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) a 20 % MeOH (C) ACN	FLD 254/630	38

Pokr. Tab. 4

Pufř	Rozpou- štědlo	Doba reakce	Odstranění činidla	Kolona	Mobilní fáze	Detekce [nm]	Citace
0,5 M uhličitán a hydrogen- uhličitán sodný, pH 10,2	AC	10 min 40 °C	Konc. HCl	Nucleodur 100-5 C <sub>18</sub> ec, 125 × 4 mm	Gradientová eluce: (A) 20 mM octan amonný a ACN (95/5 %), 1 mM dibutylamin, pH upraveno na 2,1 35 % HClO <sub>4</sub> (B) 20 mM octan amonný a ACN (90/10%), 5 mM dibutylamin, výsledné pH 8,4	FLD 262/615	39
0,25 M borátový pufř, pH 8,5	ACN	8 min	NH <sub>2</sub> OH + NaOH	Hypersil ODS, 5 μm, 250 × 4,6 mm 38 °C	Gradientová eluce: (A) 30 mM fosforečnan amonný (pH 6,5) v 15:85 MeOH/H <sub>2</sub> O (B) 15:85 MeOH/H <sub>2</sub> O (C) 90:10 ACN/H <sub>2</sub> O	FLD 270/316	40

Vysvětlivky: AC – aceton; ACN – acetonitril; ADAM – adamantamin; HEPA – heptylamin; MeOH – methanol; TEA – triethylamin; TEAA – triethylaminoctanový pufř; DAD – detektor s diodovým polem; FLD – fluorescenční detekce; UV – detekce v ultrafialové oblasti spektra

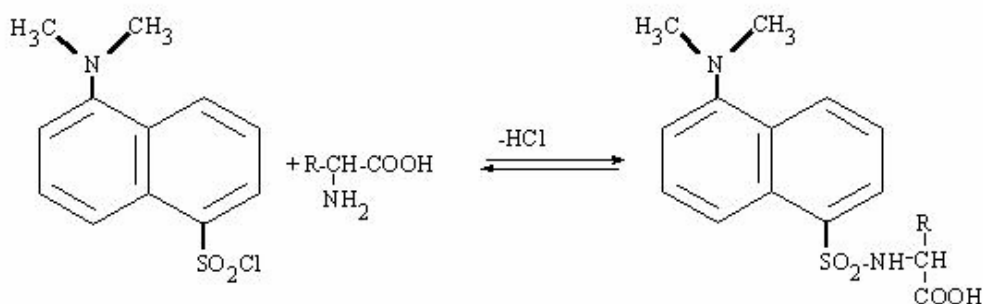
### 2.2.3.2 Dansylchlorid

Použití dansylchloridu, neboli [1-(dimethylamino)naftalen-5-sulfonyl] chloridu, je jednou z nejstarších předkolonových derivatizačních technik.<sup>41</sup> Poprvé byl použit v roce 1956 jako fluorescenční činidlo, nedlouho poté se začal používat pro značení peptidů a od 70. let také při derivatizaci v HPLC.<sup>29</sup>

Dansylchlorid reaguje s primárními i sekundárními aminokyselinami<sup>42</sup> podle schématu (Obr. 3)<sup>28</sup> za vzniku derivátů s absorpčním maximem při 254 nm. Lze též použít fluorescenční detekci s excitačním maximem 340 nm a emisním maximem 516 nm<sup>42</sup>, která však vykazuje nižší citlivost.<sup>44</sup> Aminokyseliny derivatizované Dns-Cl byly také detekovány chemiluminiscenčně postkolonovou reakcí s komplexem tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II), kdy byla citlivost v řádu pikomolů srovnatelná s UV detekcí.<sup>43</sup> Ukázky použití Dns-Cl pro derivatizaci aminokyselin jsou uvedeny v Tabulce 5.

Největším nedostatkem tohoto derivatizačního činidla je dlouhý reakční čas za pokojové teploty (až 26 hodin),<sup>45</sup> který lze zkrátit pouze zajištěním vysoké reakční teploty (až 100 °C).<sup>47</sup> Další nevýhody představují citlivost dansylderivátů aminokyselin na světlo<sup>43</sup>, tvorba multiderivátů některých aminokyselin (lysin a tyrosin), kterému lze zabránit vyšším pH reakce<sup>48</sup> a možnost interference produktu hydrolyzy s analyty. Interference může být zmírněna použitím menšího množství činidla nebo odstraněním jeho přebytku přidávkem aminokyseliny nebo extrakcí<sup>44,45</sup>, např. chloroformem.<sup>45</sup>

Výhodou je velká stabilita derivátů. Zatímco nederivatizované aminokyseliny vydrží po dobu 2 měsíců při teplotě - 80 °C, jejich derivatizované vzorky jsou stabilní při teplotě 0-4 °C až 12 měsíců.<sup>45</sup>



**Obr. 3** Schéma reakce dansylchloridu s aminokyselinami<sup>28</sup>

**Tab. 5** Tabulka stanovení aminokyselin derivatizovaných Dns-Cl

Pufr	Rozpouštědlo	Doba reakce	Odstranění činidla	Kolona	Mobilní fáze	Detekce [nm]	Citace
nasycený roztok hydrogen-uhličitanu sodného pH 9,5	AC	60 min 60 °C	L-Alanin	Luna C <sub>18</sub> , 3 μm, 100 × 4,6 mm C <sub>18</sub> Scavenger, 10 μm, 33 × 4,6 mm Synergi Hydro-RP, 4 μm, 100 × 4,6 mm s C <sub>18</sub> Securityguard, 5 μm, 4 × 3 mm předkolonkou 40 °C	Gradientová eluce: (A) 100 % ACN (B1) 25 mM CH <sub>3</sub> COONa pufr o pH 5,94 obsahující 3 % 1-propanol a 10 % ACN (B2) 10 mM heptan-sulfonátový pufr o pH 3,4 obsahující 10 % ACN	FLD 340/515	42
40 mM uhličitan litný pH 9,5	ACN	50 min	---	DuPont Zorbax ODS, 5 μm, 250 x 4,6 mm s Partisil ODS 70 x 2 mm předklonkou	Izokratická eluce: 25 mM TFA pH 7,5 a ACN 85:15	Ru(bpy) <sup>2+</sup> Cl	43
2 M hydrogen-uhličitan draselný pH 9,8	ACN	30 min 80 °C	---	Shim-pack C <sub>18</sub> , 5 μm, 150 x 4,6 mm	Izokratická eluce: 35:65 (A) MeOH/ H <sub>2</sub> O obsahující 1,5 % TEA (B) 5 mM tetrabutyl ammonium hydroxid, pH 2,5	DAD 286	44
Tetraboritan sodný pH 9	AC	16 - 26 h	Chloroform	3-aminopropyl, 5 μm, 4,6 x 250 mm	Gradientová eluce: (A) 80 % MeOH / H <sub>2</sub> O (B) octanový pufr o pH 4,6 a MeOH	FLD 305-395 / 510-650	45



Pokr. **Tab. 5**

Pufr	Rozpouštědlo	Doba reakce	Odstranění činidla	Kolona	Mobilní fáze	Detekce [nm]	Citace
0,1 M hydrogen-uhličitan sodný pH 10,5	AC	5 min 100 °C	---	RP-8, 10 µm, 4,6 x 250 mm	Gradientová eluce: (A) 50 % ACN v 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (B) 25 % ACN v 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	FLD 320/522	46
10 mM hydrogen-uhličitan sodný pH 8,5	AC	3-4 h	---	Ultrasphere-ODS, 5 µm, 4,6 x 250 mm	Gradientová eluce: (A) 10 mM octanový pufr, pH 4,18 a THF 95:5 (B) ACN/THF 90:10	FLD	47
---	---	---	---	Chromolith® Performance RP18, 100 x 4,6 mm s navázaným N-(2-hydroxydodecyl)-vankomycinem	Izokratická eluce: 0,1 % TEAA o pH 6 / MeOH 50:50	UV 254 FLD 340/530	48

Vysvětlivky: AC – aceton; ACN – acetonitril; MeOH – methanol; TEA – triethylamin; TEAA – triethylaminoctanový pufr; TFA – trifluoroctová kyselina; THF – tetrahydrofuran; DAD – detektor s diodovým polem; FLD – fluorescenční detekce; UV – detekce v ultrafialové oblasti spektra

## 2.3 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou biogenní látky nepostradatelné pro živé organismy. Celkový počet dosud zdokumentovaných aminokyselin nalezených ve všech organismech se blíží číslu 700<sup>59</sup>, ale pouze 20 z nich je základních. Lze je dělit podle různých kritérií, např. podle role v organismu na esenciální a neesenciální, nebo podle polaritý postranního řetězce na aminokyseliny s nepolárním nenabitým postranním řetězcem (glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin, fenylalanin, tryptofan, methionin), s polárním nenabitým postranním řetězcem (serin, tyrosin, threonin, cystein, asparagin, glutamin), a s nabitým postranním řetězcem (kyselina asparagová, kyselina glutamová, histidin, lysin, arginin).

Všechny aminokyseliny kromě glycinu jsou chirální sloučeniny. Jejich enantiomery se označují písmeny D a L, přičemž v živočišných a rostlinných proteinech se vyskytují především L-enantiomery, zatímco jejich D-analogy se vyskytují hlavně v mikrobiálních proteinech. Funkce D-aminokyselin v lidském těle není dosud přesně známa, ale např. u D-serinu se předpokládá, že jeho snížená hladina v mozkomíšním moku a krevním séru může souviset se schizofrenními poruchami.<sup>50</sup>

Protože aminokyseliny jsou základní stavební složkou proteinů živých organismů, je nutné přijímat je v potravě v dostatečném množství. Naše tělo se skládá především z L-enantiomerů, ale v dnešní době je velmi časté, že se v potravinách zvyšuje výskyt D-enantiomerů. Z jejich přítomnosti pak lze usuzovat o kvalitě potravin, a to z několika důvodů.<sup>51</sup>

První příčinou přítomnosti D-aminokyselin může být původ nebo způsob vzniku potravin. Pokud potravin vznikla biologickým procesem, bude obsahovat L-enantiomery. Pokud by však byla vyrobena chemickou syntézou, obsahovala by racemát enantiomerů.<sup>51</sup>

Dalším důvodem přítomnosti D-enantiomerů aminokyselin v potravinách může být nevhodné zpracování a skladování, popřípadě nevhodný způsob přepravy.<sup>51</sup> D-aminokyseliny pak vznikají činností mikroorganismů nebo v kyselém prostředí z L-analogů za přítomnosti glukosy, fruktosy nebo sacharosy.<sup>52</sup> Pouze 10–20% přijatých D-aminokyselin je z našeho těla vyloučeno, zbylých 80–90 % je zachyceno ve střevech a přeměněno na  $\alpha$ -oxokyseliny za působení specifických enzymů. Nahromadění D-aminokyselin v organismu, způsobené nízkou enzymatickou aktivitou, pak může vyvolat řadu poškození, např. potlačení růstu.<sup>52</sup> Toxicita D-enantiomerů aminokyselin

pro lidský organismus nebyla dosud jasně prokázána a také jejich metabolická dráha není zcela známá<sup>51, 52</sup>, a právě proto nabývá chirální separace aminokyselin v dnešní době na významnosti.

Množství D-enantiomerů se stává nejen spolehlivým ukazatelem kvality, kontaminace, stáří a trvanlivosti potravin a nápojů<sup>51</sup>, ale lze z něj také usuzovat o zeměpisném původu, popřípadě druhu a stupni zrání potraviny.<sup>5</sup> Pokud předpokládáme, že potravina je složena z přírodních produktů, měla by být enantiomerně čistá a obsahovat pouze L-formu aminokyselin. Přítomnost D-enantiomerů tak poukazuje buď na nevhodné technologické zacházení, např. vystavení vysoké teplotě, radiaci nebo vysokému pH, nebo na přidavek syntetických ingrediencí. Z velké části také zájem o enantiomerní poměr aminokyselin pramení z toho, že rozdílný způsob výroby stejné potraviny může vést k různým nutričním hodnotám, biologické aktivitě a senzorickým vlastnostem.<sup>51</sup>

D-aminokyseliny by neměly být přítomny v nefermentovaných výrobcích, jako jsou např. ovocné džusy, med a mléko. Výskyt významnějšího množství D-alaninu, D-asparagové kyseliny a D-glutamové kyseliny vypovídá o mikrobiální kontaminaci potraviny, u ovocných džusů především o nízké kvalitě použitého ovoce. Oproti tomu výskyt těchto enantiomerů ve fermentovaných výrobcích je zcela běžný, např. ve víně, octu, jogurtech a sýrech<sup>51</sup> a dále například v čajích (samotné listy čajovníku obsahují až 10 % D-theaninu).<sup>53</sup>

Dále je známo, že jednotlivé aminokyseliny a jejich enantiomery mají různou chuť. Obecně lze říci, že většina L-enantiomerů je hořká, zatímco jejich D-analogy jsou sladké. Například D-tryptofan, D-fenylalanin, D-histidin, D-tyrosin a D-leucin jsou údajně 35-, 7-, 7-, 6- a 4-krát sladší než sacharosa. Charakteristickou chuť a vůni potravin však nevytváří pouze aminokyseliny, ale též další chirální látky s charakteristickým enantiomerním poměrem.<sup>51</sup>

## 2.4 Čaj

V dnešní době je velmi populárním nápojem čaj díky své osvěžující chuti, jedinečnému aroma a zdraví prospěšným účinkům. Existuje několik základních druhů čaje, které se liší zpracováním, a tudíž i složením. Způsobem zpracování je myšlen proces, při kterém dochází k fermentaci polyfenolů, přesněji řečeno oxidaci, protože není využíváno mikroorganismů, ale enzymů přítomných v samotných čajových lístcích. Pokud lístky nepodlehly oxidaci, jedná se o čaj zelený nebo bílý. Oolong je polofermentovaný čaj podléhající pouze částečné oxidaci, která je zastavena pražením a černý čaj je plně fermentovaný.<sup>54</sup>

Mezi důležité složky čaje, které vytváří jeho charakteristickou chuť, patří theanin a polyfenoly. Theanin je neproteinogenní aminokyselina vytvářející sladkou chuť a polyfenoly jsou aromatické látky s charakteristickou hořkou chutí.<sup>54</sup>

Termín polyfenoly představuje souhrnné označení pro flavanoly, flavandioly, flavonoidy a fenolové kyseliny. Tyto látky tvoří až 30% sušiny čajových lístků a při fermentaci se mění na červené až červenohnědé látky, theaflaviny a thearubigininy.<sup>55, 56</sup> Flavonoly, neboli katechiny, jsou nejvíce zastoupenou skupinou polyfenolů. Nejznámější jsou (-)-epigallokatechin 3-gallát, (-)-epigallokatechin, (-)-epikatechin, a (-)-epikatechin 3-gallát.<sup>55</sup> Tyto látky mají velmi významné antioxidační účinky, daleko výraznější než vitamin C a E. Protože však ve fermentovaných čajích podléhají přeměně, má zelený čaj až 6x větší antioxidační vlastnosti než čaj černý.<sup>57</sup>

Theanin při fermentačním procesu také podléhá rozkladu, a to na ethylamin a kyselinu glutamovou, takže teoreticky by nejkvalitnější černé čaje měly obsahovat nejméně theaninu. Studie však ukázala, že některé černé čaje obsahují více theaninu než čaje zelené.<sup>54</sup> Problém nejspíš bude v tom, že každý z analyzovaných čajů pocházel z jiné plantáže. V tomto ohledu by asi bylo nejlepší, kdyby bylo možné analyzovat různé druhy čajů pocházející z jedné plantáže a pokud možno také ze stejné sklizně.

Koncentrace ostatních aminokyselin v čaji narůstá již při procesu sušení lístků, protože dochází k hydrolýze proteinů. Aminokyselinové složení čaje se samozřejmě mění také při fermentačních úpravách. Obecně lze říci, že nejvíce volných aminokyselin obsahují zelené a bílé čaje. Některé aminokyseliny se však objevují až po fermentačním kroku, např. alanin a arginin, jiné fermentací mizí, např. glycin.<sup>54</sup>

Mezi další látky přítomné v čaji patří methylxantiny – kofein, theobromin a theofylin. Tyto látky mají podobné povzbuzující účinky. Kofein nejsilněji působí na svaly a mozek, theofylin je silný stimulant srdce, respiračního systému a ledvin a theobromin má podobné účinky jako theofylin, ale působí nejslaběji. Nejvíce kofeinu obsahuje černý čaj, zelený oproti němu obsahuje pouze 1/3 jeho množství.<sup>57</sup> V jednom šálku černého čaje je obsaženo průměrně 50 mg kofeinu, což odpovídá pouze 40-50 % jeho množství v kávě. Protože mnoho lidí má v dnešní době problémy se spánkem, jsou k dostání i různé druhy čajů, ze kterých byl kofein extrahován, ale byly v nich ponechány zdraví prospěšné polyfenoly.<sup>56</sup>

Blahodárné účinky zeleného čaje na lidský organismus byly známy už ve staré Číně. Je známo, že obsahuje velké množství antioxidantů, které zvyšují imunitu a působí proti rakovině, dále zelený čaj snižuje krevní tlak, brání ukládání cholesterolu, snižuje množství cukru v krvi, má antibakteriální účinky, snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob a zvyšuje mozkovou aktivitu.<sup>57</sup> Účinky zeleného čaje proti rakovině byly prokázány na mnoha zvířecích modelech, a to u rakoviny kůže, prostaty, jater, plic, prsu, tlustého střeva, jícnu a konečníku.<sup>58</sup>

Vzhledem tomu, že zelený čaj nepodléhá fermentaci, je jeho složení velmi podobné složení listů čajovníku. V Tabulce 6 je uvedeno složení listů čajovníku a účinky jednotlivých složek.<sup>57</sup>

Jak již bylo zmíněno dříve, čaj je známým nápojem díky svým zdraví prospěšným účinkům. Jednou z mnoha látek, které mu tyto účinky propůjčují, je theanin. Tato aminokyselina je dobře rozpustná ve vodě, a proto se z čajových lístků uvolňuje velmi snadno, oproti tomu polyfenoly se do vody uvolňují o něco pomaleji. Fenolické sloučeniny jsou v čajových lístcích obsaženy ve velkém množství a svou přítomností mohou výrazně narušovat analýzu theaninu a dalších aminokyselin.<sup>59</sup> Proto je časté, že se tyto látky od aminokyselin ve vzorku čaje oddělují extrakcí na pevné fázi. V Tabulkách 7A a 7B jsou uvedeny základní údaje o separacích theaninu získané z literatury.

**Tab. 6** Chemické složení mladých listů čajovníku <sup>57</sup>

<b>Látka</b>	<b>Množství</b>	<b>Účinky</b>
<b>Polyfenoly</b>	10 - 25 %	Antioxidanty, působí proti vzniku rakoviny, snižují hladinu cholesterolu, zpomalují zvyšování krevního tlaku, snižují srážlivost červených krvinek, antibiotické účinky, prevence proti alergiím, eliminují tělesný zápach, příznivé účinky na střevní mikroflóru
<b>Flavonoly</b>	0,6 - 0,7 %	Zvyšují odolnost cév, antioxidanty, snižují krevní tlak, eliminují tělesný zápach
<b>Kofein</b>	2 - 4 %	Povzbuzuje centrální nervový systém, prevence proti astmatu, zvyšuje metabolickou aktivitu, močopudný
<b>Glykosidy</b>	0,6 %	Prevence proti zvyšování obsahu cukru v krvi
<b>Vitamin C</b>	150 – 250 mg	Antioxidant, působí proti rakovině
<b>Vitamin E</b>	25 - 70 mg	Antioxidant, působí proti rakovině, prevence proti neplodnosti
<b>Karoten</b>	13 - 29 mg	Antioxidant, působí proti rakovině, zvyšuje imunitu
<b>Saponiny</b>	0,1 %	Působí proti rakovině, protizánětlivé účinky
<b>Fluoridy</b>	90 - 350 ppm	Ochrana před zubním kazem
<b>Zinek</b>	30 - 75 ppm	Prevence proti kožním zánětům, podporuje imunitu
<b>Selen</b>	1 - 1,8 ppm	Antioxidant, působí proti rakovině, prevence chýtrání srdečního svalu
<b>Hořčík</b>	400 - 2000 ppm	Antioxidant, zlepšuje imunitu

**Tab. 7A** Přehled vybraných stanovení theaninu s rozlišením enantiomerů

Analyt	Kolona	Mobilní fáze	Derivatizační činidlo	Detekce [nm]	Citace
D,L-theanin a enantiomerní čistota potravinových doplňků s theaninem	Astec Chirobiotic T 25 x 4,6 mm	Nederivatizovaný: 80:20 (A:B) FMOC-Cl: 30:70 (A: 100 % H <sub>2</sub> O) Dns-Cl: 35:65 (A: 100 % H <sub>2</sub> O) AQC: 30:70 (A: 100 % MeOH) (A) 1,0 % NH <sub>4</sub> TFA v MeOH, (B) 0,1 % kyselina mravenčí v H <sub>2</sub> O	Bez derivatizace: <b>LOD 10 ng/ml</b> FMOC-Cl: <b>LOD 500 ng/ml</b> Dansylchlorid: <b>LOD 1 mg/ml</b> AQC: <b>LOD 500 ng/ml</b>	MS	7
D,L-theanin	C <sub>18</sub> a $\gamma$ -cyklodextrin Cyclobond II-2000, 5 $\mu$ m 250 x 4,6 mm	ACN / H <sub>2</sub> O / kyselina octová / TEA C <sub>18</sub> : 300:700:2,0/0,5 $\gamma$ CD: 1000/35/4/0,5	FMOC-Gly-Cl	UV 266	54
L-theanin	Hypersil HyPURITY Elite C18, 5 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm  Nova-Pack C <sub>18</sub> , 4 $\mu$ m, 150 x 3,9 mm	Gradientová eluce: (A) 5 mM pentadekafluorooktanová kyselina v H <sub>2</sub> O (B) 5 mM pentadekafluorooktanová kyselina v ACN  Izokratická eluce: H <sub>2</sub> O s 0,00003 % (w/v) amoniakem, 0,5 % (v/v) kyselinou mravenčí a 2 % (v/v) ACN	<i>o</i> -ftalaldehyd	FLD 340/425  MS	60
D,L-theanin	Astec Chirobiotic T 250 x 4,6 mm s Chirobiotic T 200 x 4,0 mm předklonkou	Izokratická eluce: 1 % NH <sub>4</sub> TFA v MeOH a 0,1 % kyselina mravenčí v H <sub>2</sub> O 80:20	Bez derivatizace	MS	62
L-theanin	Luna C <sub>18</sub> , 5 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm s C <sub>18</sub> předkolonkou	Gradientová eluce: (A) 10 mM SDS v 65 % deionizované vodě, 35 % ACN a 0,1 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (B) 5 % ACN	Bez derivatizace	DAD 205 $\pm$ 4	67
L-theanin	AccQ.Tag <sup>TM</sup> , 3,9 x 150 mm, 4 $\mu$ m 37 °C	Gradientová eluce: (A) vodný roztok Waters AccQ.Tag Elute A (B) ACN (C) deionizovaná voda	AccQ.Fluor Reagent	FLD 250/395	68

**Tab. 7B** Přehled vybraných stanovení theaninu bez rozlišení enantiomerů

Kolona	Mobilní fáze	Derivatizační činidlo	Detekce [nm]	Citace
Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> , 5 μm, 150 x 4,6 mm	Gradientová eluce: (A) MeOH / ACN / H <sub>2</sub> O (45/45/10) (B) fosfátový pufr o pH 7,5	<i>o</i> -ftalaldehyd <b>LOD 11,1 ng</b> <b>LOQ 37 ng</b>	DAD 338	59
Spherigel C <sub>18</sub> , 5 μm, 250 x 4,6 mm, T = 30 °C	Gradientová eluce: (A) 0,5 % kyselina mravenčí v H <sub>2</sub> O (B) ACN	Bez derivatizace <b>LOD 1,7ng</b> <b>LOQ 5,0 ng</b>	DAD 200	63
Inertsil ODS-3v, 5 μm, 250 x 4,0 mm, T = 30 °C	Gradientová eluce: (A) ACN (B) destilovaná voda s 0,5 % kyselinou mravenčí	2,4-Dinitrofluorbenzen <b>LOD 360 ± 5,2 pg</b>	UV 254	64
Phenomenex Jupiter C <sub>18</sub> , 5 μm, 125 x 4,6 mm	Gradientová eluce: (A) 50 mM fosfátový pufr (pH 5,5), MeOH, THF (80:19:1) (B) MeOH a 50 mM s fosfátovým pufrem (pH 5,5) (80:20)	<i>o</i> -ftaladehyd <b>LOD 20 ng/ml</b> <b>LOQ 50 ng/ml</b>	FLD 340/450	65
Jupiter C <sub>18</sub> , 5 μm, 250 x 4,6 mm	Gradientová eluce: (A) 0,14 M CH <sub>3</sub> COONa obsahující 0,05 % (v/v) TEA o pH 6,8 s ledovou kyselinou octovou a MeOH (90:10) (B) 60:40 ACN ve vodě	<i>o</i> -ftaladehyd <b>LOD 0,12 μg</b> <b>LOQ 0,35 μg</b> Fenylisothiokyanát <b>LOD 0,25 ng</b> <b>LOQ 0,75 ng</b>	UV 340 UV 254	66

Vysvětlivky: ACN – acetonitril; AQC – 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát; Dns-Cl – dansylchlorid; FMOC-Cl – 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid; FMOC-Gly-Cl – 9-fluorenylmethoxykarbonyl glycyl chlorid; MeOH – methanol; SDS – dodecylsulfát sodný; TEA – triethylamin; THF – tetrahydrofuran; DAD – detektor s diodovým polem; FLD – fluorescenční detekce; MS – hmotnostní detekce; UV – detekce v ultrafialové oblasti spektra



## 2.5 Theanin

Theanin (Obr. 4), systematickým názvem  $\gamma$ -glutamylethylamid nebo 5-N-ethyl glutamin je hlavní aminokyselinou obsaženou v čaji. Jeho množství obvykle činí 1-2 % sušiny čajových lístků a více než 50 % celkového množství aminokyselin v čaji.<sup>54</sup> Theanin byl poprvé objeven roku 1949 japonskými vědci v lístcích čajovníku *Camellia sinensis*. Jediným dalším přírodním zdrojem theaninu je hřib hnědý, *Xerocomus badius*.<sup>53</sup>

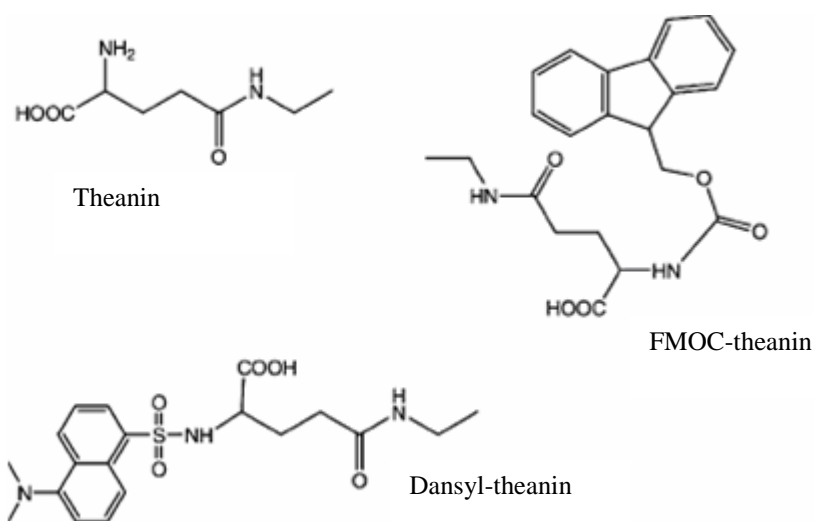
Prekurzory pro biosyntézu theaninu jsou kyselina glutamová a ethylamin. Proces probíhá v nadzemní části rostliny za přítomnosti enzymu theanin syntetázy, odkud je pak theanin transportován do nově rostoucích lístků, kde slouží jako zdroj dusíku a uhlíku.<sup>54</sup>

Theanin je jednou z mnoha látek, které dávají zdraví prospěšné účinky čaji, např. snižuje krevní tlak, zmírňuje nežádoucí efekty kofeinu jako jsou podrážděnost a nervozita, působí proti rakovině, zlepšuje paměť, navozuje stav relaxace bez pocitu ospalosti, přispívá k dobré kvalitě spánku a schopnosti soustředění a učení se, odbourává stres a stísněnost, zmírňuje premenstruační syndromy a podporuje imunitní systém.<sup>53, 59</sup>

Poprvé byl L-theanin schválen jako doplněk stravy pro své zdraví prospěšné účinky v Japonsku roku 1964 a nyní existuje více než 50 potravinových doplňků obsahujících L-theanin.<sup>53</sup> Navzdory tomu, že roku 1990 byla v Japonsku vynalezena metoda produkce vysoce čistého L-theaninu za použití mikroorganismů,<sup>53</sup> je i dnes problém s enantiomerní čistotou potravinových doplňků na bázi theaninu, jak ukázala studie z roku 2003.<sup>7, 53</sup> V této studii bylo analyzováno šest komerčně dostupných výrobků, které měly všechny obsahovat pouze L-theanin, ale pět z nich obsahovalo racemát. Toto zjištění je poměrně důležité, protože stále ještě není známo, jaké má D-theanin účinky a jestli není ve větším množství zdraví nebezpečný.

Zato metabolická dráha L-theaninu již byla detailně prozkoumána, především kvůli jeho zdraví prospěšným účinkům. L-theanin je po požití zažívacím ústrojím absorbován do krve a transportován do mozku leucinovými přenašeči. Jeho koncentrace zde významně narůstá a maxima dosahuje 20-30 minut po požití.<sup>53</sup> K akumulaci L-theaninu v těle nedochází, do 24 hodin je metabolizován především v ledvinách a nakonec je vyloučen močí.<sup>53, 60</sup> Jakékoli toxické efekty L-theaninu dosud nebyly prokázány ani ve vysokých dávkách, kdy bylo krysám každý den po 13 týdnů podáváno 4000 mg/kg této látky.<sup>61</sup>

Právě proto, že potravinové doplňky na bázi theaninu jsou často vyráběny jako racemáty, byla na krysách provedena studie <sup>62</sup>, jejímž cílem bylo stanovit, jestli D- a L-theanin mají stejné farmakokinetické vlastnosti, jestli je racemát metabolizován stejným způsobem jako jednotlivé enantiomery a jestli přítomnost obou enantiomerů ovlivňuje jejich absorpci v gastrointestinálním traktu a vylučování močí. Zajímavým výsledkem této studie bylo zjištění, že přítomnost D-enantiomeru snižuje absorpci L-enantiomeru a naopak. Dále bylo zjištěno, že D-theanin je přednostně vylučován močí, zatímco L-theanin je v ledvinách nejprve metabolizován na ethylamin a kyselinu glutamovou, a až poté vyloučen močí. Z těchto poznatků je jasné, že enantiomery theaninu nejsou bioekvivalentní, a proto může být působení a efektivita potravinových doplňků rozdílná v závislosti na jejich enantiomerním složení.



**Obr. 4** Struktury theaninu a jeho derivátů vzniklých reakcí s derivatizačními činidly používanými v této práci, dansylchloridem a 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridem <sup>1</sup>

## **3. Experimentální část**

### **3.1 Použité chemikálie**

- Methanol Chromasolv gradient grade pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Acetonitril Chromasolv gradient grade pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Triethylamin (TEA), čistota  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina octová 99 %, čistota p.a. (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Hydrogenuhlíčan sodný, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Hydroxid sodný, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- N-pentan, čistota p.a. (Lachema, Brno, ČR)
- Deionizovaná voda byla připravena filtračním systémem Mili-Q (Millipore, Milford, MA, USA).
- Zelený čaj Leros Millenium exclusive green tea (Leros, Praha, ČR)
- L-theanin – ochrana a uvolnění (Naturix, Vetrisol s.r.o., Praha, ČR)
- Standardy:
  - Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
    - DL-iso-leucin, čistota  $\geq 99$  %; D-iso-leucin, čistota  $\geq 98$  %
    - DL-alanin, čistota  $\geq 99$  %; L-alanin, čistota  $\geq 99$  %; D-alanin, čistota  $\geq 99$  %
    - L-leucin, čistota  $\geq 98$  %; D-leucin, čistota  $\geq 99$  %
    - L-theanin
    - 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid, čistota  $\geq 99$  %
    - dansylchlorid, čistota  $\geq 99$  %
  - Fluka (Buchs, Švýcarsko)
    - DL-valin, čistota  $\geq 99$  %; D-valin, čistota  $\geq 98$  %
    - L-iso-leucin, čistota  $\geq 99$  %
    - DL-leucin, čistota  $\geq 99$  %
  - DL-theanin a D-theanin byly obdrženy jako dar od Dr. D.W. Armstronga, University of Texas

## 3.2 Přístroje a pomůcky

Většina měření pro detekci derivatizovaných a nederivatizovaných aminokyselin probíhala na kapalinovém chromatografu Breeze System, který se skládá z gradientové pumpy 1525, degaséru, autosampleru 717 Plus, termostatu Jetstream 2 Plus, UV/VIS dvoukanalového detektoru 2487 a jednotky pro sběr a zpracování dat s počítačovým softwarem Breeze verze 3.30 SPA. Vše bylo zakoupeno od firmy Waters, Milford, USA.

Optimalizace mobilní fáze pro FMOC-deriváty aminokyselin byla uskutečněna na kapalinovém chromatografu Delta Chrom SDS 030 (Watrex, Praha, ČR), který se skládá z pumpy SDS 030 (Watrex, Praha, ČR), UV/VIS detektoru Delta Chrom UVD 200 (Watrex, Praha, ČR), dávkovacího ventilu Rheodyne 7125 s dávkovací smyčkou 20  $\mu\text{l}$  (Cotati, CA, USA) a jednotky pro sběr a zpracování dat s počítačovým softwarem Clarity verze 2.1 (Data Apex, Praha, ČR).

Pro stanovení limitů detekce a stanovitelnosti při fluorescenční detekci byl použit kapalinový chromatograf, jehož součástí byly vysotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, fluorescenční detektor FL 2000 (Spektra System, USA), membránový vakuový odplyňovač CSI6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5  $\mu\text{l}$  a jednotka pro sběr a zpracování dat s počítačovým softwarem Clarity verze 2.8.1.584 (Data Apex, Praha, ČR).

Systém pro měření hmotnostního spektra se skládal z kapilárního kapalinového chromatografu Agilent Technologies 1200 Series připojeném ESI rozhraním k trojitému kvadrupólu Triple Quad LC/MS 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany). Systém se dále skládal z automatického injektoru, termostatu, degaséru a čtyřcestné pumpy. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu MassHunter Workstation Acquisition (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany).

Jako chirální stacionární fáze byly použity dvě kolony 250 mm x 4,6 mm, Chirobiotic T a Chirobiotic TAG. Chirobiotic T je teikoplanin vázaný na silikagelový nosič, se zrněním 5  $\mu\text{m}$  a velikostí pórů 8 nm. Chirobiotic TAG je teikoplanin aglykon vázaný na silikagelový nosič, se zrněním 5  $\mu\text{m}$  a velikostí pórů 8 nm. Kolona Chirobiotic TAG byla zakoupena od firmy Astec (Advanced Separation Technologies Inc.), Whippany, NJ, USA. Kolona Chirobiotic T byla zakoupena od firmy Supelco, Bellefonte, USA.

Dále byla použita ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30 (Elma, Německo), k měření pH pufru pH metr PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Kodaň, Dánsko), k vážení aminokyselin a derivatizačních činidel byly použity analytické váhy Mettler AE 240 (Greifensee, Švýcarsko). K dávkování do chromatografu s fluorescenčním detektorem a chromatografu Delta Chrom byla použita injekční stříkačka Microlitter Syringe 702 o objemu 25  $\mu$ l (Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko). K míchání pufrů a zahřívání reakčních směsí byla použita magnetická míchačka Stuart heat-stit CB 162 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK), k promíchání vzorků byla použita minitřepačka IKA MS 3 Basic (IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) a k odstředování vzorků byla použita centrifuga Centrifuge 5418 eppendorf (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany u Prahy, ČR). Roztoky byly v případě potřeby filtrovány přes 0,45  $\mu$ m filtry Sartorius Minisart (Goettingen, Německo).

Pro prekoncentraci theaninu byly použity SPE kolonky Merck-LiChrolut RP-18 (40 - 63  $\mu$ m) 500mg/3ml (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a SCX kolonka Supelco Discovery<sup>®</sup> SPE ion exchange 500mg/3ml (Supelco, Bellefonte, USA) .

K uchovávání vzorků a vytváření reakčních směsí byly použity plastové eppendorfky Simport T331-10N o objemu 1,5 ml (Simport, Beloeil, QC, Canada).

Pro grafické zpracování chromatogramů byl použit program Origin 6.1 a pro vyhodnocení limitů detekce a stanovitelnosti enantiomerů theaninu byl použit počítačový program Breeze 3.30 SPA.

### **3.3 Mobilní fáze a podmínky měření**

Pro chirální separaci nederivatizovaných aminokyselin byly použity chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu a teikoplaninu aglykonu. Jako mobilní fáze byla pro obě kolony použita směs methanolu s destilovanou vodou. Měření byla provedena při vlnové délce 205 nm a při průtoku 1 ml/min na koloně Chirobiotic T a 0,5 ml/min na koloně Chirobiotic TAG.

Chirální separace nederivatizovaného theaninu a vzorků čaje s hmotnostní detekcí (HPLC-ESI/MS) probíhala na koloně Chirobiotic T při průtoku 0,5 ml/min. Jako zmlžovací a sušící plyn byl pro iontový zdroj použit dusík. Teplota sušícího plynu byla 250 °C, průtok 11 l/min a tlak byl 50 psi (345 kPa). Napětí na kapiláře bylo 3,5 kV pro analýzu pozitivně nabitých iontů a 4 kV pro negativně nabité ionty. Data byla

analyzována v módu SIM (selective ion monitoring). Napětí na fragmentoru bylo 80 V a doba skenu byla 500 ms. Pro pozitivně nabitě ionty byl poměr hmotnost/náboj ( $m/z$ ) 175, pro negativně nabitě ionty 173 (respektive 173,1).<sup>69</sup>

Pro separaci derivatizovaných aminokyselin byly použity mobilní fáze skládající se z methanolu a 1,0 % nebo 0,5 % triethylaminoctanového pufru (TEAA) o pH 4,0, 5,0 a 6,0. Pufř byl připraven z destilované vody a triethylaminu, na požadovanou hodnotu pH byl upraven přidávkem kyseliny octové. Měření byla provedena na koloně Chirobiotic T za průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

Detekce UV/VIS detektorem aminokyselin derivatizovaných FMOC-Cl<sup>3</sup> probíhala při vlnové délce 262 nm a fluorescenční detekce probíhala při vlnových délkách 254 nm pro excitaci a 314 nm pro emisi záření.

Detekce aminokyselin derivatizovaných dansylchloridem probíhala v UV oblasti při 254 nm<sup>48</sup> a fluorescenční detekce probíhala při vlnových délkách 340 nm pro excitaci a 516 nm pro emisi záření.<sup>42</sup>

Všechna měření na kapalinovém chromatografu Breeze a na kapalinovém chromatogramu s hmotnostní detekcí probíhala za teploty 25 °C. Analýzy s fluorescenční detekcí a na chromatografu Delta Chrom probíhaly za laboratorní teploty pohybující se v rozmezí  $22 \pm 2$  °C. Před použitím na kapalinovém chromatografu Delta Chrom byly mobilní fáze odvzdušňovány po dobu 15 - 30 minut v ultrazvukové lázni.

### 3.4 Příprava a uchování vzorků a činidel

Všechny používané aminokyseliny (theanin, valin, leucin, isoleucin, alanin) byly analyzovány ve formě racemátů, čisté enantiomery byly použity pouze pro určení elučního pořadí enantiomerů v racemátech. Všechny vzorky a činidla byly uchovávány v lednici při 4 °C.

Nederivatizované aminokyseliny byly pro chirální separaci připraveny rozpuštěním 1 mg aminokyseliny v 1 ml methanolu nebo destilované vody. Tento zásobní roztok byl následně ředěn příslušným rozpouštědlem na požadovanou koncentraci.

Derivatizace pomocí FMOC-Cl byla provedena podle literatury.<sup>3</sup> Aminokyseliny byly rozpuštěny v 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> o pH 9,0 (pH bylo na výslednou hodnotu upraveno přidávkem 0,5 M NaOH), aby derivatizační činidlo neposkytovalo dva píky a nenarušovalo tak separaci. Roztok FMOC-Cl byl připraven rozpuštěním v acetonitrilu.

Aminokyseliny o koncentraci 0,2 mg/ml pak byly smíchány s FMOC-Cl o stejné koncentraci v poměru 1:4. Směs byla vortexována a 20 minut ponechána v klidu při laboratorní teplotě.

V průběhu optimalizace však tento postup derivatizace z neznámých důvodů začal poskytovat dva píky derivatizačního činidla a daleko menší odezvu. Pro zvýšení odezvy začal být FMOC-Cl k aminokyselinám přidáván v desetinásobném koncentračním nadbytku a v poměru 1:1.

Deriváty dansylchloridu byly připraveny podle postupu v literatuře.<sup>44, 70</sup> Aminokyseliny byly rozpuštěny v destilované vodě na koncentraci 1 mg/ml. Roztok derivatizačního činidla byl připravován vždy nový rozpuštěním 0,02 g dansylchloridu v 1 ml acetonitrilu. Derivatizační směs obsahovala 100 µl roztoku aminokyseliny, 60 µl 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> o pH 9,5 (pH upraveno na požadovanou hodnotu přidavkem 0,5 M NaOH) a 60 µl dansylchloridu. Směs pak byla důkladně promíchána.

Pro porovnání efektivity dansylace bylo zvoleno několik způsobů přípravy derivátů: reakce při laboratorní teplotě přes noc (14 hodin), reakce v temnu a za světla při teplotě 80 °C po dobu 30, 45 a 50 minut. Po uplynutí daného času byla reakce zastavena přidavkem 40 µl kyseliny octové a vychlazená směs byla centrifugována po dobu 5 min.

Zelený čaj byl připravován několika způsoby. První vzorek byl připraven zalitím 0,250 g čaje 10 ml destilované vody, směs pak byla zahřívána 20 min při teplotě 90 °C. Druhý vzorek byl připraven zalitím stejného množství čaje 10 ml vřící užitkové vody a byl ponechán louhovat 20 min při laboratorní teplotě. Oba vzorky byly poté doplněny na původní objem 10 ml a po vychlazení byly přefiltrovány přes 0,45 µm nylonový filtr. Tyto vzorky byly následně derivatizovány oběma činidly postupy popsány dříve.

Pro zvýšení obsahu theaninu ve vzorku byl další roztok zeleného čaje připraven zalitím 1,9 g čaje 20 ml vřící užitkové vody. Směs pak byla ponechána 20 minut v klidu při laboratorní teplotě. Následně byl vylouhovaný čaj promíchán a přefiltrován přes 0,45 µm filtr. V tomto vzorku byla analyzována přítomnost theaninu jednak metodou bez použití derivatizace a jednak derivatizací FMOC-Cl.

SPE kolonky pro prekoncentraci theaninu byly před nadávkováním vzorku nejprve aktivovány 5 ml methanolu a 5 ml destilované vody. Poté bylo na kolonku nanášeno 5 ml roztoku L-theaninu rozpuštěného v destilované vodě o koncentracích 0,5, 0,05 a 0,005 mg/ml, dále 1 ml vody, pak byly profouknuty vzduchem a nakonec promyty 1 ml methanolu.

Tableta L-Theanin byla rozdrčena v třecí misce s tloučkem a pro jednotlivé analýzy byl vždy vytvořen nový roztok tablety. Pro analýzu v nederivatizované podobě a pro derivatizaci dansylchloridem byla tableta rozpuštěna v destilované vodě. Pro analýzu derivatizací FMOCCl byla tableta rozpuštěna v 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> o pH 9,0.

### 3.5 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla vyhodnocována programy Clarity, verze 2.8.1.584 a Breeze, verze 3.30 SPA. U naměřených chromatogramů byly vypočítány retenční časy, retenční faktory a hodnoty rozlišení píků.

Hodnoty retenčních faktorů  $k$ , které slouží k porovnání retenčních časů analytů a charakterizují míru interakce se stacionární fází, byly vypočteny podle vztahu

$$k = (t_R - t_M) / t_M, \quad (1)$$

kde  $t_R$  je retenční čas, tzn. celkový čas který analyt setrvá v separační koloně a  $t_M$  je mrtvý čas kolony, tzn. čas složky vzorku, která není na koloně zadržována a pohybuje se stejnou rychlostí jako mobilní fáze.

Rozlišení  $R_{1,2}$  charakterizuje míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Je-li hodnota  $R_{1,2} \geq 1,5$  jsou píky odděleny až na základní linii. Hodnoty rozlišení byly vypočteny podle vztahu

$$R_{1,2} = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (w_1 + w_2), \quad (2)$$

kde  $t_{R,1}$  a  $t_{R,2}$  jsou retenční časy dříve a později eluujícího analytu a  $w_1$  s  $w_2$  jsou šířky píků při základně.

Separční faktor  $\alpha_{1,2}$  charakterizuje selektivitu chromatografického systému vůči separovaným látkám. Popisuje vzájemný poměr retencí dvou analytů. Je dán vztahem

$$\alpha_{1,2} = k_2 / k_1, \quad (3)$$

kde  $k_2$  je retenční faktor později eluujícího analytu a  $k_1$  retenční faktor dříve eluujícího analytu. Platí-li  $\alpha_{1,2} = 1$ , nedochází k vzájemné separaci analytů.



## 3.6 Výsledky a diskuze

### 3.6.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin

Nederivatizované aminokyseliny byly analyzovány enantioselektivně na stacionárních fázích Chirobiotic T a Chirobiotic TAG a výsledky separace byly vzájemně porovnány. Separace probíhaly na obou kolonách v mobilních fázích skládajících se z methanolu a vody v různých poměrech. Dále byla porovnána velikost odezvy aminokyselin při vlnových délkách 210 nm a 205 nm, přičemž větší odezva byla zaznamenána při vlnové délce 205 nm. Proto byla použita pro veškerá měření nederivatizovaných aminokyselin.

#### **3.6.1.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic TAG**

Na koloně Chirobiotic TAG byly analyzovány aminokyseliny L-theanin, DL-alanin, DL-valin, DL-leucin a DL-iso-leucin (separace D-theaninu nebyla provedena, protože v době měření na této koloně ještě nebyl k dispozici).

Eluční pořadí enantiomerů bylo zjištěno analýzou čistých enantiomerů nebo přidávkem jednoho enantiomeru k racemátu. Vždy docházelo k dřívější eluci L-enantiomerů před jejich D-analogy.

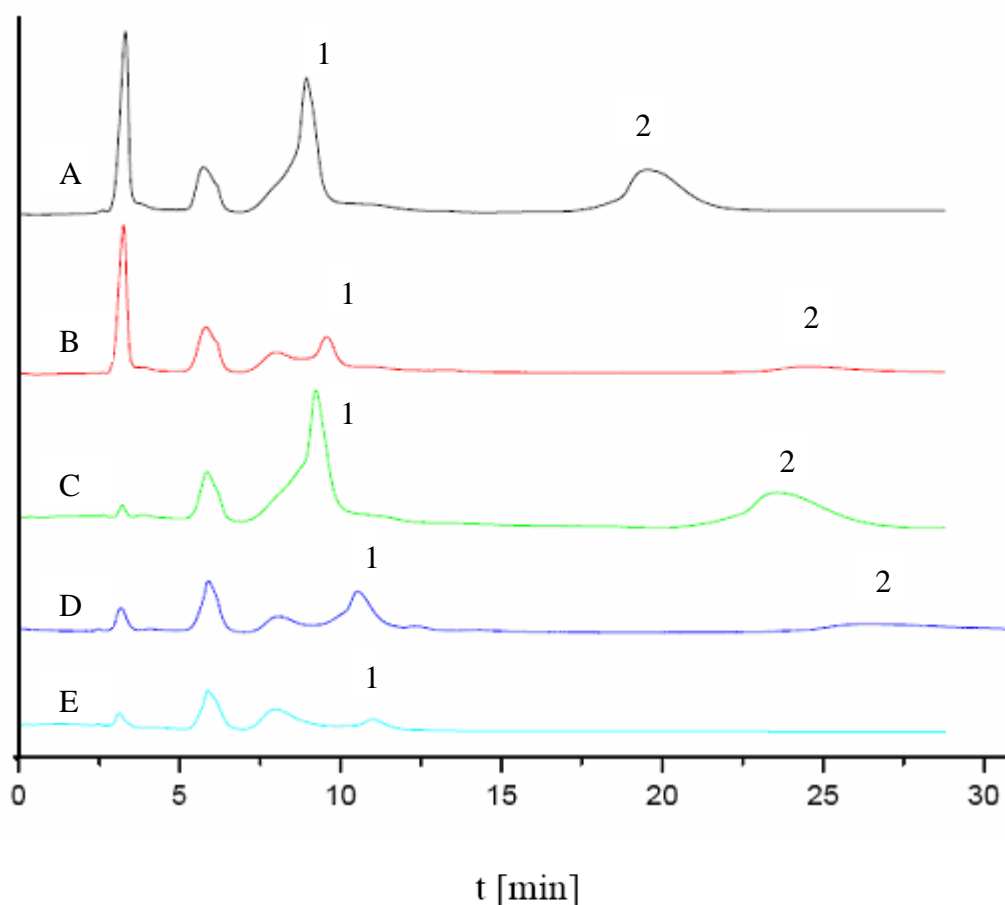
Roztoky aminokyselin byly připravovány nejprve rozpuštěním v methanolu, ale separace byla narušována jeho systémovými píky, které se nacházely v místě eluce L-enantiomerů aminokyselin, a které se při změně složení mobilní fáze i průtoku posouvaly společně s píky analytů. (Obr. 5) Z tohoto důvodu pak byl vzorek theaninu pro zjištění limitů detekce a stanovitelnosti rozpuštěn v destilované vodě.

Protože na této koloně byl i při nízkém průtoku vysoký tlak, byl zvolen průtok 0,5 ml/min, což zapříčinilo delší retenci analytů. Z důvodu dlouhé retence D-enantiomerů docházelo k velkému rozmývání jejich píků u všech separovaných aminokyselin.

Při optimalizaci složení mobilní fáze byly porovnávány retenční časy aminokyselin. Jako optimalizovaný byl zvolen poměr methanolu a vody 60/40 (v/v), protože při vyšším obsahu methanolu docházelo ke koeluci L-theaninu se systémovým

píkem vody a při nižším obsahu methanolu byla jeho retenční příliš dlouhá. V Tabulce 8 jsou zaznamenány retenční časy, retenční faktory, separační faktory a rozlišení píků jednotlivých aminokyselin v optimalizované mobilní fázi.

Je patrné, že rozlišení D- a L-enantiomerů jednotlivých aminokyselin je velmi dobré, i přes velké rozmytí píků. Dělení směsi racemátů aminokyselin by však nebylo možné z důvodu podobných retenčních časů.



**Obr. 5** Chromatogramy separace DL-aminokyselin rozpuštěných v methanolu na koloně Chirobiotic TAG při složení optimalizované mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnové délce detekce 205 nm a průtoku 0,5 ml/min, teplota 25 °C. Označení: A – valin, B – leucin, C – isoleucin, D – alanin, E – theanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.

**Tab. 8** Tabulka retenčních časů, retenčních faktorů, separačních faktorů a rozlišení píků jednotlivých aminokyselin rozpuštěných v methanolu. Separační podmínky: kolona Chirobiotic TAG, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min, UV detekce 205 nm, teplota 25 °C.

Aminokyselina	$t_R$ [min]	$k$	$\alpha_{DL}$	$R_{DL}$
L-Thea	11,00	2,53	---	---
L-Val	8,98	1,72	2,90	5,09
D-Val	19,74	4,98		
L-Leu	9,57	1,95	3,37	6,00
D-Leu	24,56	6,56		
L-Izo	9,23	1,88	3,38	4,84
D-Izo	23,57	6,35		
L-Ala	10,53	2,32	3,17	3,85
D-Ala	26,50	7,35		

#### **3.6.1.1.1 Kalibrační závislost L-theaninu na koloně Chirobiotic TAG**

Za optimalizovaných podmínek o složení mobilní fáze methanol/voda v objemovém poměru 40/60 při vlnové délce detekce 205 nm byla na koloně Chirobiotic TAG proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na koncentraci L-theaninu. Kalibrační závislost D-theaninu nebyla proměřena.

Kalibrační roztoky byly získány ředěním zásobního roztoku L-theaninu o koncentraci 1 mg/ml. Protože vzorky rozpuštěné v methanolu poskytovaly několik systémových píků v místě odezvy analytu, byla pro kalibraci vytvořena série vzorků L-theaninu rozpuštěného ve vodě, což zredukovalo množství systémových píků a zlepšilo efektivitu separace. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí 0,5-0,005 mg/ml. Na každé koncentrační hladině bylo měření provedeno třikrát. Závislosti odezvy na koncentraci byly zpracovány pomocí lineární regrese.

Ze získaných regresních rovnic závislosti výšky píků na koncentraci byl vypočítán limit detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) jako trojnásobek resp. desetinásobek hodnoty šumu. Výsledné parametry rovnic pro plochy a výšky píků jsou uvedeny v Tabulce 9 společně s limity detekce a stanovitelnosti.

**Tab. 9** Koeficienty regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti nederivatizovaného L-theaninu. Separační podmínky: kolona Chirobiotic TAG, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min, UV detekce 205 nm, teplota 25 °C.

	<b>Směrnice</b> [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	<b>Úsek</b> [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	<b>R</b>
<b>Výška píku</b>	$7.71 \cdot 10^5$	$7.9 \cdot 10^5$	0,9991
<b>Plocha píku</b>	$3,97 \cdot 10^7$	$1,95 \cdot 10^5$	0,9999
<b>LOD</b>	0,332 $\mu\text{g/ml}$		
<b>LOQ</b>	1,11 $\mu\text{g/ml}$		

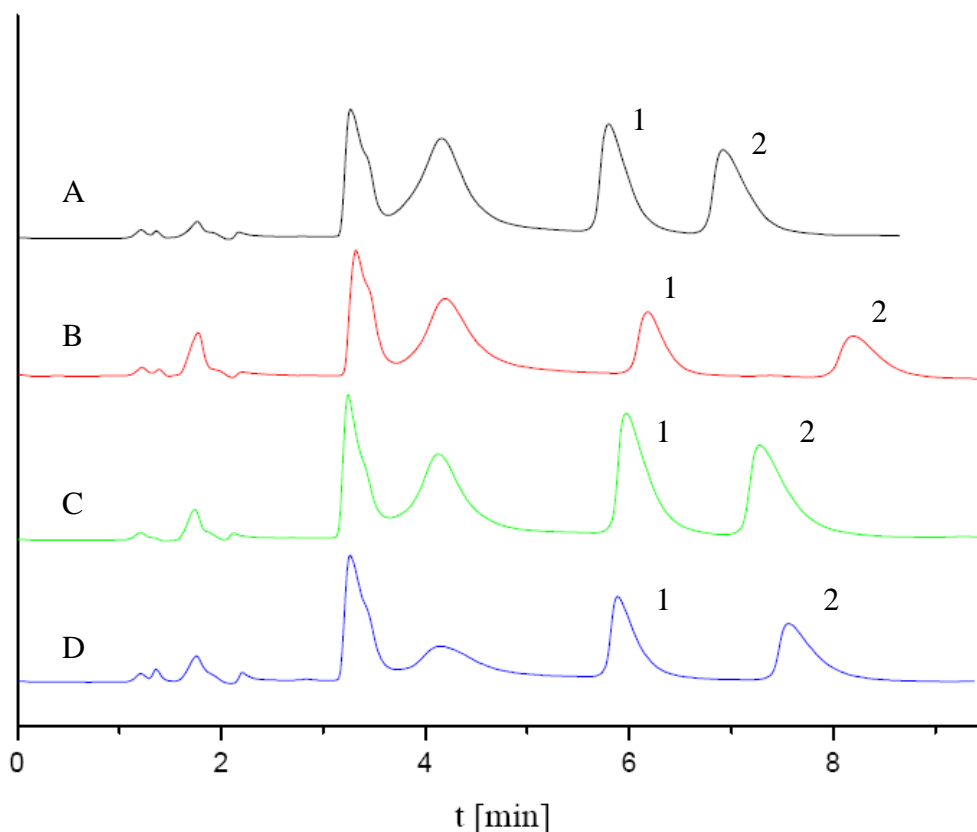
### 3.6.1.2 Separace nederivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic T

Na koloně Chirobiotic T byly proměřeny aminokyseliny DL-alanin, DL-valin, DL-leucin, DL-isoleucin, a DL-theanin. Eluční pořadí enantiomerů bylo zjištěno analýzou čistých enantiomerů nebo přidavkem jednoho enantiomeru. Jako při použití CSP s navázaným teikoplaninem aglykonem docházelo vždy k eluci L-enantiomerů před jejich D-analogy.

Pro lepší porovnání se stacionární fází Chirobiotic TAG bylo zvoleno stejné složení mobilní fáze, tzn. methanol/voda v poměru 60/40 (v/v). Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, což způsobilo rychlejší eluci analytů a tím i podstatně menší rozmývání píků.

V chromatogramech jsou opět velice výrazné systémové píky methanolu, ale tentokrát jejich přítomnost nijak nenarušovala separaci, nedocházelo k jejich koeluci s píky aminokyselin (Obr. 6), ale i přes to byly píky theaninu rozpuštěného v destilované vodě více symetrické. Reprezentativní chromatogram separace theaninu je na Obrázku 7.

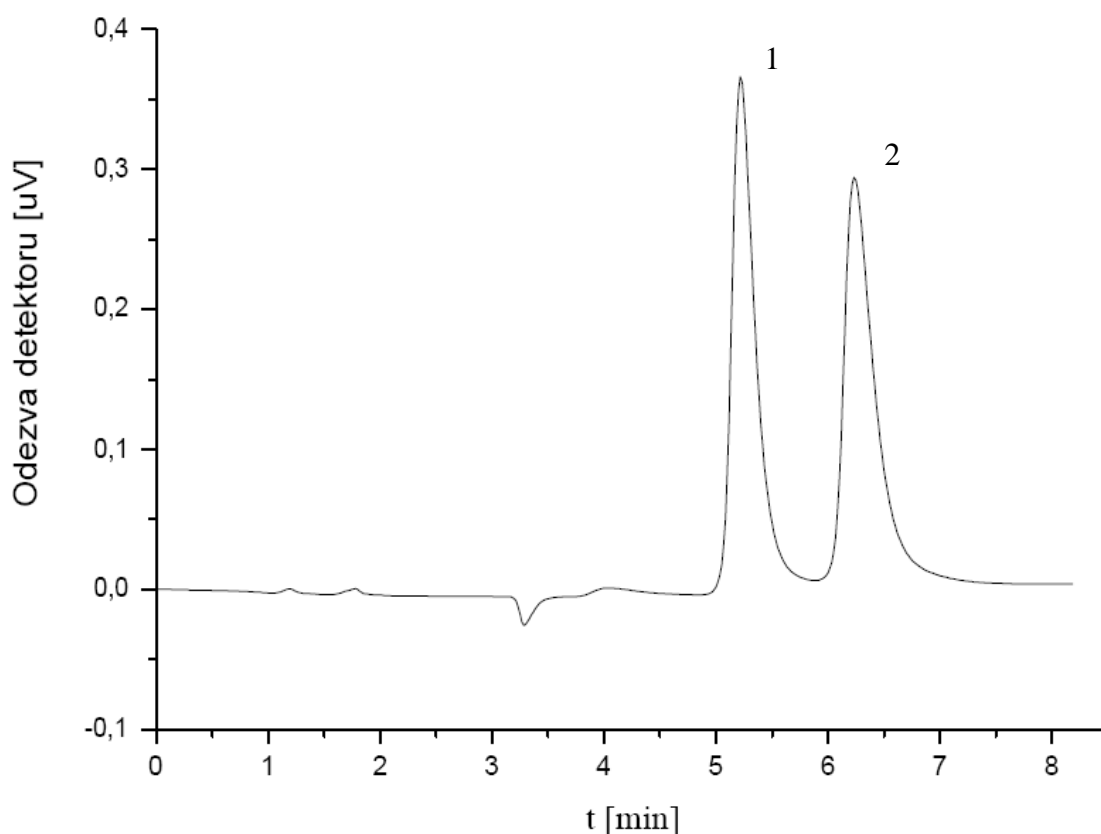
Naměřené hodnoty retenčních časů, retenčních faktorů, separačních faktorů a rozlišení píků jsou shrnuty v Tabulce 10. Z tabulky je patrné, že enantiomerní páry jednotlivých aminokyselin se podařilo rozdělit vždy až na základní linii. Naopak dělení všech enantiomerů v případné směsi by možné nebylo vzhledem ke koeluci L-aminokyselin. D-enantiomery studovaných aminokyselin se alespoň částečně dělily (Obr. 8). Eluční pořadí D-enantiomerů bylo valin < izoleucin < leucin.



**Obr. 6** Chromatogramy separace DL-aminokyselin rozpuštěných v methanolu na koloně Chirobiotic T při složení optimalizované mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnové délce detekce 205 nm a průtoku 1 ml/min, teplota 25 °C. Označení: A – valin, B – leucin, C – isoleucin, D – alanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.

**Tab. 10** Tabulka retenčních časů, retenčních faktorů, separačních faktorů a rozlišení píků jednotlivých aminokyselin rozpuštěných v methanolu. Separační podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, UV detekce 205 nm, teplota 25 °C.

Aminokyselina	$t_R$ [min]	$k$	$\alpha_{DL}$	$R_{DL}$
<b>L-Thea</b>	5,20	0,54	1,55	2,32
<b>D-Thea</b>	6,21	0,84		
<b>L-Val</b>	5,78	0,71	1,47	1,98
<b>D-Val</b>	6,90	1,04		
<b>L-Leu</b>	6,17	0,83	1,72	3,40
<b>D-Leu</b>	8,18	1,42		
<b>L-Izo</b>	5,95	0,76	1,51	2,27
<b>D-Izo</b>	7,27	1,15		
<b>L-Ala</b>	5,87	0,74	1,67	3,14
<b>D-Ala</b>	7,55	1,23		

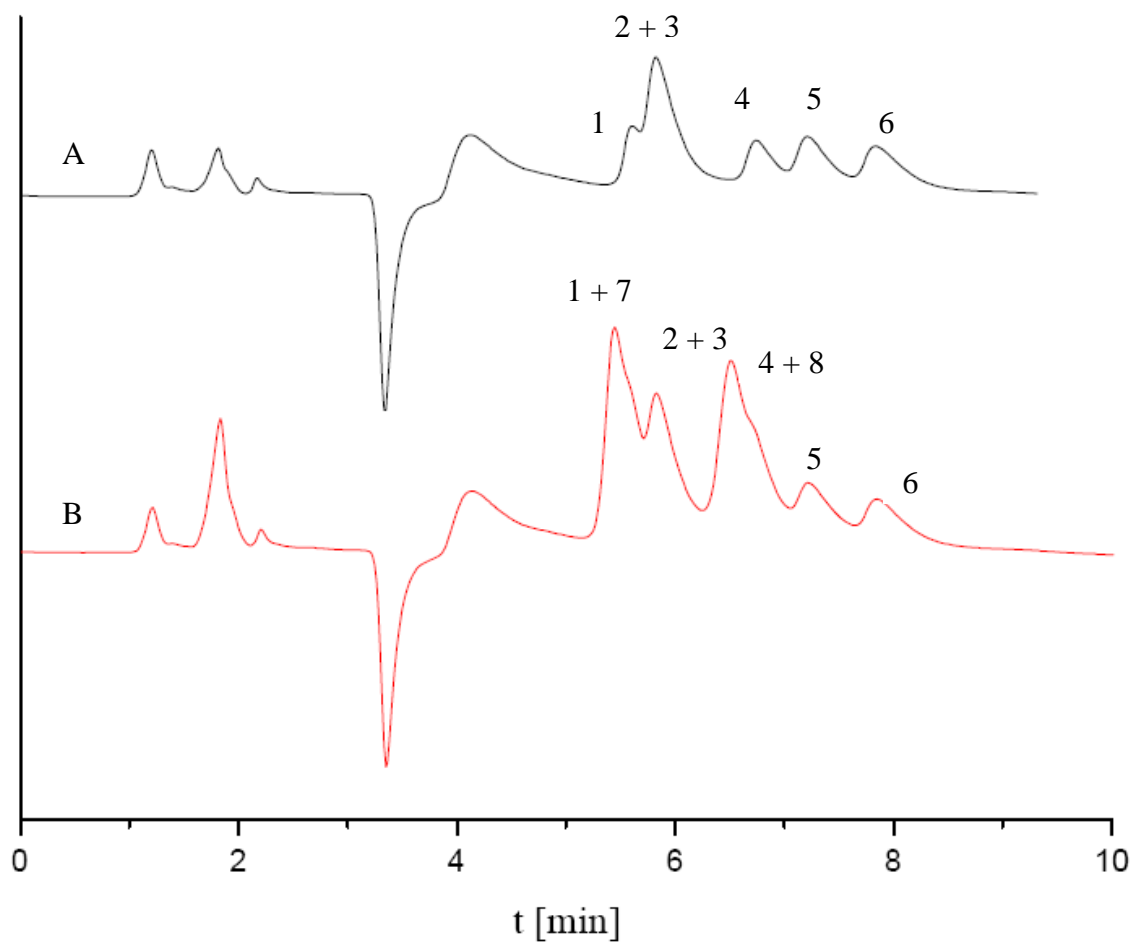


**Obr. 7** Chromatogram separace DL-theaninu rozpuštěného v destilované vodě na koloně Chirobiotic T při složení optimalizované mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnové délce detekce 205 nm a průtoku 1 ml/min, teplota 25 °C. Označení: 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.

### **3.6.1.2.1 Separace směsi DL aminokyselin**

Na koloně Chirobiotic T byla provedena separace D a L enantiomerů valinu, leucinu, a isoleucinu. Bylo zjištěno, že L-enantiomery od sebe nelze oddělit. I při změnách ve složení mobilní fáze docházelo ke koeluci všech píků L-enantiomerů. D-enantiomery se dělily v mobilní fázi složené z methanolu a vody při poměru 60/40 (v/v) a eluovaly v pořadí valin < isoleucin < leucin a byly odděleny téměř až na základní linii.

Do této směsi byly také přidány oba enantiomery theaninu, ale ani jeden z nich nebylo možné od směsi oddělit, a to ani při změnách ve složení mobilní fáze. Vždy docházelo ke koeluci L-theaninu s ostatními L-enantiomery aminokyselin ve směsi a D-theanin eluoval společně s D-valinem. Pro ilustraci jsou na Obrázku 8 zachyceny chromatogramy separace směsi DL-valinu, leucinu, isoleucinu a směsi DL-theaninu, valinu, leucinu a isoleucinu.



**Obr. 8** Chromatogram separace směsí aminokyselin obsahujících: A) DL-valin, leucin, isoleucin B) DL-valin, leucin, isoleucin, theanin. Separací podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnová délka detekce 205 nm, průtok 1 ml/min, teplota 25 °C. Označení: 1 – L-valin, 2 – L-isoleucin, 3 – L-leucin, 4 – D-valin, 5 – D-isoleucin, 6 – D-leucin; 7 – L-theanin, 8 – D-theanin.

### 3.6.1.2.2 Kalibrační závislost DL-theaninu na koloně Chirobiotic T

Za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/voda v poměru 60/40 (v/v) při vlnové délce detekce 205 nm byla na koloně Chirobiotic T proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na koncentraci D- a L-theaninu.

Kalibrační roztoky byly získány ředěním zásobního roztoku DL-theaninu rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 mg/ml. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí 0,5-0,0025 mg/ml. Na každé koncentrační hladině bylo měření provedeno třikrát. Závislosti odezvy na koncentraci byly zpracovány pomocí lineární regrese.

Ze získaných regresních rovnic závislosti výšky píků na koncentraci byl následně vypočten limit detekce a stanovitelnosti. Výsledné koeficienty rovnic pro plochy a výšky píků jsou uvedeny v Tabulce 11 společně s limity detekce a stanovitelnosti.

**Tab. 11** Regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti nederivatizovaných enantiomerů theaninu. Separáční podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), pr tokov  rychlost 1 ml/min, UV detekce 205 nm, teplota 25  C.

<b>L-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$5,34 \cdot 10^5$	$7,44 \cdot 10^2$	0,9992
<b>Plocha píku</b>	$2,08 \cdot 10^7$	$1,64 \cdot 10^4$	0,9999
<b>LOD</b>	0,255 $\mu\text{g/ml}$		
<b>LOQ</b>	0,849 $\mu\text{g/ml}$		
<b>D-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$1,19 \cdot 10^6$	$7,45 \cdot 10^3$	0,9974
<b>Plocha píku</b>	$1,05 \cdot 10^7$	$3,83 \cdot 10^4$	0,9975
<b>LOD</b>	0,568 $\mu\text{g/ml}$		
<b>LOQ</b>	1,89 $\mu\text{g/ml}$		



### 3.6.1.3 Porovnání kolon

Z naměřených retenčních časů na obou kolonách na bázi teikoplaninu Chirobiotic T a Chirobiotic TAG je patrné, že kolona Chirobiotic TAG více zadržuje aminokyseliny, především jejich D-enantiomery. Díky tomu poskytuje nejen lepší rozlišení, ale také lepší separační účinnost. Píky D-enantiomerů byly poměrně hodně rozmyté vlivem větší retence vlivem nižšího průtoku mobilní fáze.

Vlivem dlouhých retenčních časů byly limity detekce a stanovitelnosti L-theaninu na koloně Chirobiotic TAG nepatrně nižší než na koloně Chirobiotic T (Tab. 12). Z těchto výsledků je patrné, že pro UV detekci nederivatizovaných aminokyselin byla v tomto případě vhodnější kolona obsahující teikoplaninovou chirální stacionární fázi, ale lze předpokládat, že by se limity detekce a stanovitelnosti na koloně s navázaným teikoplaninem aglykonem podstatně snížily, pokud by byly vyhodnocovány při větším průtoku mobilní fáze.

**Tab. 12** Porovnání limitů detekce a stanovitelnosti L-theaninu naměřených na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic TAG za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/voda 60/40 (v/v), při průtokové rychlosti 1 ml/min resp. 0,5 ml/min, vlnové délce detekce 205 nm a teplotě 25 °C.

<b>Kolona</b>	<b>LOD [<math>\mu\text{g/ml}</math> ]</b>	<b>LOQ [<math>\mu\text{g/ml}</math> ]</b>
<b>T</b>	0,255	0,849
<b>TAG</b>	0,332	1,11

### **3.6.2 Separace a kvantifikace derivatizovaných aminokyselin**

Pro porovnání vhodnosti použití derivatizačních činidel pro aminokyseliny byly vybrány dvě látky, a to 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl) a dansylchlorid (Dns-Cl). Porovnávány byly limity detekce a stanovitelnosti derivátů DL-theaninu při UV a fluorescenční detekci. Všechny separace probíhaly na koloně Chirobiotic T termostátované na teplotu 25 °C a při průtoku mobilní fáze 1 ml/min.

Optimalizovaná mobilní fáze se u obou derivatizačních činidel skládala z methanolu a 1 % triethylaminoctanového pufru (TEAA) o pH 6,0.

#### **3.6.2.1 Derivatizace aminokyselin pomocí FMOC-Cl**

Derivatizace pomocí derivatizačního činidla FMOC-Cl byla provedena podle literatury.<sup>3</sup> Postup derivatizace aminokyselin (theanin, valin, leucin, izoleucin, alanin) je popsán v kapitole 3.4 v experimentální části. Detekce v UV oblasti byla nastavena na 262 nm a při fluorescenční detekci byly vlnové délky excitace a emise 254 a 314 nm.<sup>3</sup>

##### **3.6.2.1.1 Optimalizace separace aminokyselin derivatizovaných FMOC-Cl**

Pro zvolení vhodných složek mobilní fáze byla nejprve provedena separace v mobilní fázi methanol/voda v objemových poměrech 60/40 a 40/60. Shodně s popisem v literatuře<sup>3</sup> nedocházelo k separaci enantiomerů, oba eluovaly v jednom píku mezi druhou a třetí minutou separovány od píku derivatizačního činidla. Proto byla následně použita mobilní fáze skládající se z methanolu a TEAA pufru v různých objemových poměrech. V průběhu optimalizace metody byly použity 0,5 % a 1 % TEAA pufrů o pH 4,0, 5,0 a 6,0. V Tabulce 13 je zaznamenán vliv pH pufru na retenci a separaci FMOC-DL-aminokyselin.

**Tab. 13** Vliv pH pufru na retenci a separaci FMOC-DL-aminokyselin. Separální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1% TEAA v poměru 30/70 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 262 nm.

<b>pH</b>	$k_L$	$k_D$	$\alpha_{DL}$	$R_{DL}$
<b>Theanin</b>				
<b>4,0</b>	0,51	0,81	1,57	3,67
<b>5,0</b>	2,31	6,59	2,85	6,81
<b>6,0</b>	1,45	4,76	3,28	6,96
<b>Valin</b>				
<b>4,0</b>	0,68	1,01	1,48	3,58
<b>5,0</b>	2,10	6,38	3,03	5,15
<b>6,0</b>	1,70	5,98	3,51	6,89
<b>Leucin</b>				
<b>4,0</b>	0,79	1,38	1,74	4,83
<b>5,0</b>	2,79	11,59	6,14	8,00
<b>6,0</b>	2,20	10,67	4,84	9,16
<b>Izoleucin</b>				
<b>4,0</b>	0,73	1,11	1,53	3,22
<b>5,0</b>	3,11	8,35	2,68	6,23
<b>6,0</b>	1,86	7,69	4,13	10,50
<b>Alanin</b>				
<b>4,0</b>	0,71	6,06	8,58	4,96
<b>5,0</b>	2,74	9,34	3,41	6,98
<b>6,0</b>	2,03	9,64	3,42	7,07

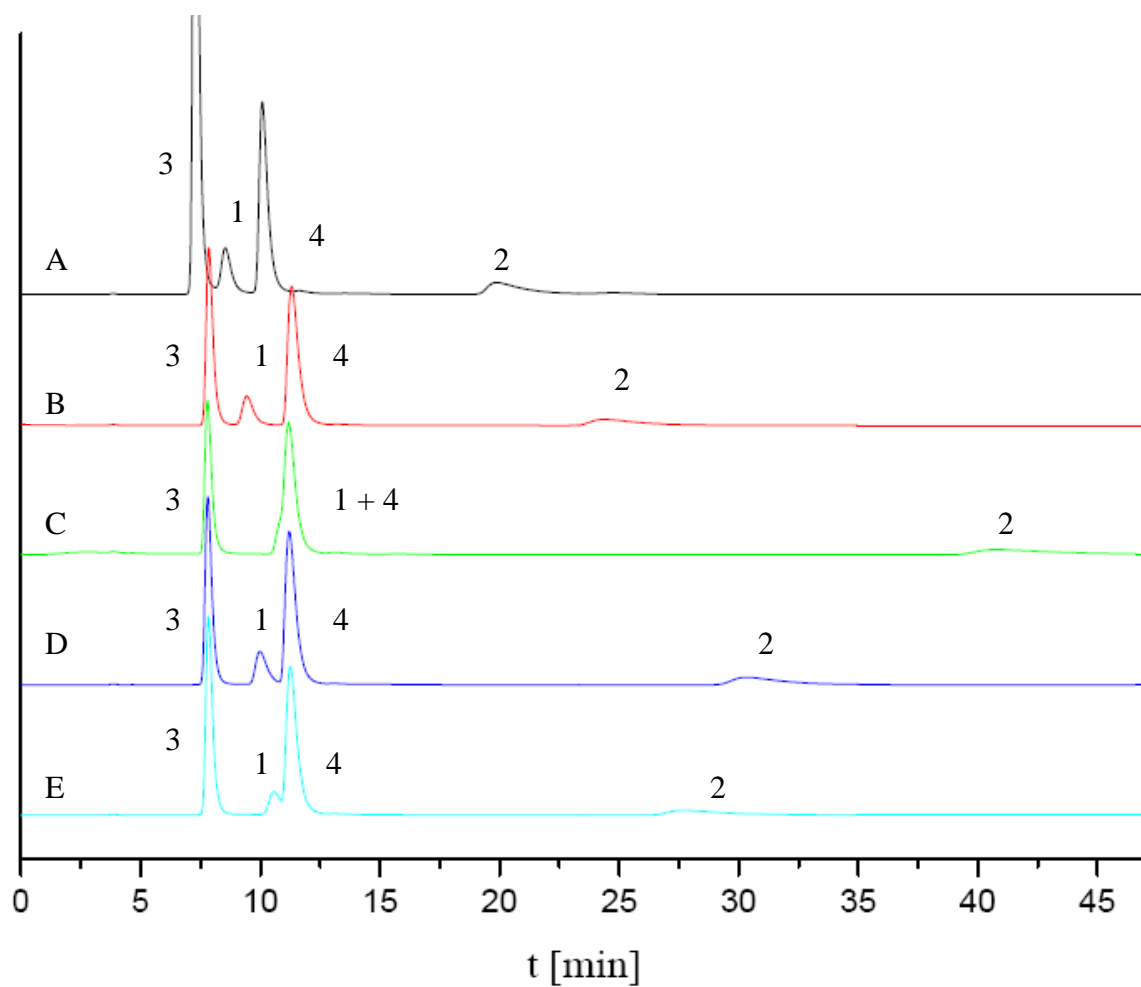
Při optimalizaci mobilní fáze byl nejprve použit 0,5 % pufr o pH 4,0. Při objemovém poměru methanol/pufr 40/60 docházelo ke koeluci L-enantiomerů aminokyselin s píkem derivatizačního činidla. Při změně poměru methanol/pufr na 30/70 (v/v) byly píky lépe oddělené, ale stále nedocházelo k separaci na základní linii. Proto byl ještě vyzkoušen poměr 25/75 (v/v), kdy rozlišení bylo nejlepší, ale retenční časy byly příliš vysoké.

Jako další byl použit 1 % TEAA pufr o pH 4,0, kdy opět v mobilní fázi 40/60 (v/v) docházelo ke koeluci L-enantiomerů s píkem derivatizačního činidla a při poměru 30/70 (v/v) nedocházelo k separaci na základní linii. Snížení dávkovaného objemu z 20  $\mu$ l na 10  $\mu$ l pomohlo k lepší separaci L-enantiomerů od píku FMOC-Cl.

Dále byl použit 0,5 % a 1 % TEAA pufr o pH 5,0. Při obou koncentracích pufru docházelo k rozdělení L-enantiomerů od píku FMOC-Cl při poměru methanol/pufr 30/70 (v/v), ale zároveň byla eluce D-enantiomerů při tomto pH nejdelší.

Nejlepší separace bylo dosaženo při použití TEAA pufru o pH 6,0. Složení mobilní fáze methanol/0,5 % TEAA pufr 40/60 (v/v) bylo optimální v předchozí separaci aminokyselin<sup>3</sup>, ale v mých analýzách v této mobilní fázi docházelo ke koeluci píku produktu hydrolýzy derivatizačního činidla FMOC-OH s píkem D-theaninu.

Při použití mobilní fáze MeOH/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v objemovém poměru 30/70 eluoval L-theanin přímo mezi píky derivatizačního činidla a D-theanin až daleko za nimi. Proto byla tato mobilní fáze vybrána jako optimální. Sice v této mobilní fázi docházelo u některých L-enantiomerů aminokyselin (leucin, alanin) ke koeluci s píkem FMOC-OH, ale jejich stanovení nebylo hlavní (Obr. 9). Nakonec byl jako ideální poměr složek mobilní fáze vybrán methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v objemovém poměru 32/68, kdy sice byla celková doba analýzy 24 minut, ale pík L-theaninu byl přesně mezi píky derivatizačního činidla a nic nenarušovalo jeho separaci.



**Obr. 9** Chromatogramy separace Fmoc-DL-aminokyselin na koloně Chirobiotic T při složení optimalizované mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 30/70 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 262 nm, teplota 25 °C. Označení: A – theanin, B – valin, C – leucin, D – isoleucin, E – alanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer, 3 – Fmoc-Cl, 4 – Fmoc-OH.

### **3.6.2.1.2 Extrakce pentanem**

U několika stanovení aminokyselin popsaných v literatuře byla pro odstranění přebytku derivatizačního činidla a jeho produktu hydrolýzy použita extrakce rozpouštědlem, např. pentanem<sup>32, 38</sup>, ale podle některých autorů<sup>34</sup> by tato extrakce mohla mít za následek ztrátu určité části derivatizované aminokyseliny (prokázáno u histidinu, ornithinu, lysinu). V této práci při extrakci pentanem nebyly zaznamenány žádné ztráty derivátů theaninu, spíše docházelo k zakoncentrování theaninu a s tím spojenému zvýšení odezvy.

### **3.6.2.1.3 Kalibrační závislost FMOC-DL-theaninu**

Za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 32/68 (v/v), detekce v UV oblasti (262 nm) a fluorescenčně (vlnová délka excitace/emise 254/314 nm) byla na koloně Chirobiotic T proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na koncentraci derivátů D- a L-theaninu.

Kalibrační roztoky pro UV detekci byly získány smísením DL-theaninu a FMOC-Cl v poměru 1:1 při desetinasobném koncentračním nadbytku FMOC-Cl. Roztoky pro fluorimetrickou detekci byly získány naředěním zásobního roztoku FMOC-DL-theaninu o koncentraci 15 µg/ml získaného předchozím postupem. Standardy nebyly připravovány stejně, protože při velmi nízkých koncentracích theaninu nedocházelo k derivatizaci.

Pro detekci v UV oblasti byly proměřeny koncentrace FMOC-DL-theaninu v rozmezí 0,04-1 mg/ml, což odpovídá koncentracím 0,02-0,05 mg/ml pro jednotlivé enantiomery. Pro fluorimetrickou detekci byly proměřeny koncentrace FMOC-DL-theaninu v rozmezí 0,4-1 µg/ml, což odpovídá koncentracím 0,2-0,5 µg/ml pro jednotlivé enantiomery. Na každé koncentrační hladině bylo měření provedeno třikrát. Závislosti odezvy na koncentraci byly zpracovány pomocí lineární regrese.

Ze získaných regresních rovnic závislosti výšky píků na koncentraci FMOC-Cl derivátů byly následně vypočteny limity detekce a stanovitelnosti. Výsledné koeficienty rovnic pro plochy a výšky píků jsou uvedeny v Tabulkách 14 a 15 společně s příslušnými limity detekce a stanovitelnosti. Z tabulek je patrné, že fluorimetrickou detekcí byly získány limity přibližně o polovinu nižší než pro detekci v UV oblasti spektra.

**Tab. 14** Koeficienty regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti enantiomerů theaninu derivatizovaných FMOC-Cl. Separační podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, UV detekce 262 nm, teplota 25 °C.

<b>L-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$2,095 \cdot 10^6$	$-2,53 \cdot 10^3$	0,9992
<b>Plocha píku</b>	$5,98 \cdot 10^7$	$3,35 \cdot 10^4$	0,9993
<b>LOD</b>	9,50 ng/ml		
<b>LOQ</b>	31,7 ng/ml		
<b>D-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$5,28 \cdot 10^5$	$-1,72 \cdot 10^2$	0,9991
<b>Plocha píku</b>	$5,84 \cdot 10^7$	$-1,70 \cdot 10^5$	0,9976
<b>LOD</b>	37,7 ng/ml		
<b>LOQ</b>	126 ng/ml		

**Tab. 15** Koeficienty regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti enantiomerů theaninu derivatizovaných FMOC-Cl. Separační podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1% TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, fluorescenční detekce excitace/emise 254/314 nm.

<b>L-theanin</b>			
	Směrnice [ $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\text{mV}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$1,87 \cdot 10^6$	$-2,89 \cdot 10^3$	0,9913
<b>Plocha píku</b>	$7,67 \cdot 10^6$	$-6,62 \cdot 10^5$	0,9929
<b>LOD</b>	0,755 ng/ml		
<b>LOQ</b>	2,52 ng/ml		
<b>D-theanin</b>			
	Směrnice [ $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\text{mV}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$3,31 \cdot 10^5$	$-5,95 \cdot 10^2$	0,9927
<b>Plocha píku</b>	$6,54 \cdot 10^6$	$-5,80 \cdot 10^5$	0,9915
<b>LOD</b>	4,26 ng/ml		
<b>LOQ</b>	14,2 ng/ml		

### 3.6.2.2 Derivatizace aminokyselin dansylchloridem

Derivatizace aminokyselin (DL-theanin, valin, leucin, isoleucin, alanin) byla provedena podobně jako v literatuře.<sup>44, 70</sup> Postup je detailně popsán v kapitole 3.4 v experimentální části.

Pro porovnání efektivity dansylace bylo zvoleno několik způsobů přípravy derivátů. Protože v literatuře<sup>43, 44, 45, 47, 70</sup> často probíhala reakce ve tmě kvůli citlivosti dansylderivátů na světlo, byla porovnána efektivita dansylace v temnu a na světle při 80 °C probíhající 30, 45 a 50 minut s reakcí trvající 14 hodin za laboratorní teploty přes noc.

Výsledky ukázaly (Obr. 10), že přístup světla nemá na reakci negativní vliv. Při porovnání ploch píků derivátů vzniklých za srovnatelných podmínek na světle a ve tmě bylo zjištěno, že plochy píků derivátů vzniklých na světle byly poněkud větší. Také vždy platilo, že plochy píků se zvětšovaly s rostoucí dobou reakce. Největší odezvu však vykazovaly píky derivátů vzniklých při laboratorní teplotě po 14 hodin derivatizace, a proto byl tento způsob derivatizace vybrán jako optimální pro svou jednoduchost a nepotřebu zvýšené teploty.

Vlnová délka detekce byla také vybrána podle literatury. Pro UV oblast bylo zvoleno 254 nm<sup>42</sup> a pro fluorescenční detekci 340/516 nm<sup>48</sup> (excitace/emise).

#### **3.6.2.2.1 Optimalizace separace dansylovaných aminokyselin**

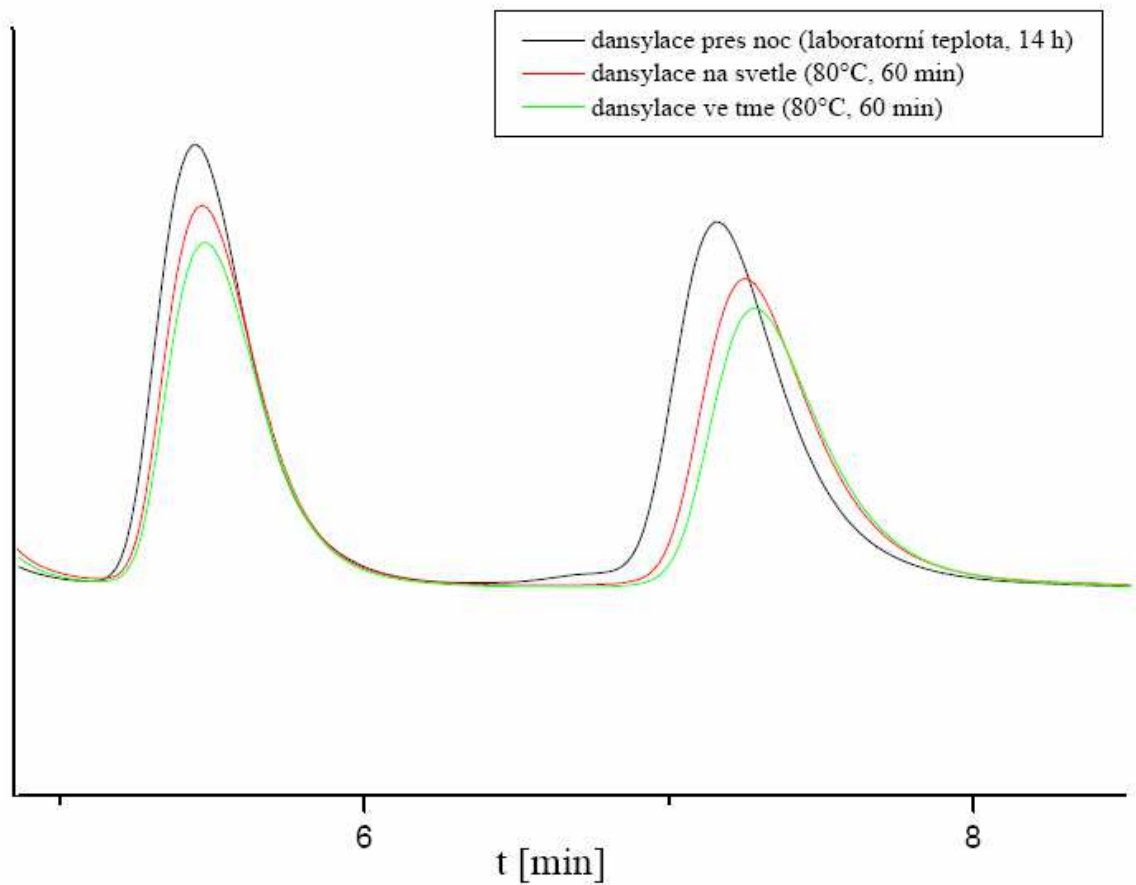
Byly porovnány mobilní fáze skládající se z methanolu a 0,5 % a 1 % TEAA pufru o pH 6,0 v různých poměrech. V Tabulce 16 je zaznamenán vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci dansylovaných aminokyselin

Nejlepší separace s 0,5 % TEAA pufrém bylo dosaženo při objemovém poměru mobilní fáze 35/65. Při poměru methanol/pufr 40/60 (v/v) byl pík L-theaninu příliš blízko píku derivatizačního činidla a při poměru 30/70 (v/v) vykazovaly píky enantiomerů poměrně dlouhé retenční časy a rozmývaly se.

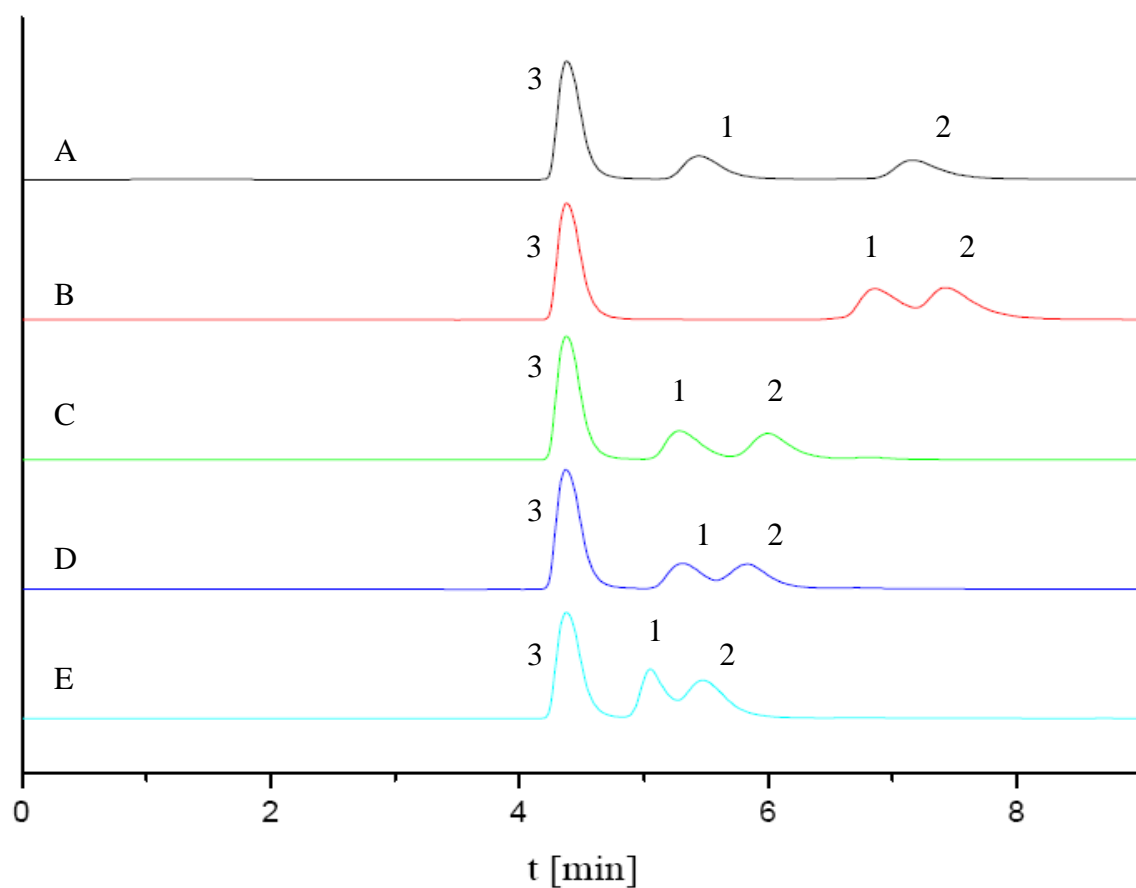
Při použití 1 % TEAA pufru bylo dosaženo nejlepší separace v mobilní fázi methanol/pufr 40/60 (v/v), která se retencemi téměř shodovala s mobilní fází složenou z methanolu a 0,5 % TEAA pufru o objemovém poměru 35/75.

Po porovnání rozlišení a separační účinnosti byl jako optimalizovaná mobilní fáze zvolena fáze o složení methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v) (Obr. 11).





**Obr. 10** Optimalizace teploty a doby dansylační reakce pro dansylaci theaninu. Separální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 254 nm, teplota 25 °C.



**Obr. 11** Chromatogramy separace Dns-DL-aminokyselin na koloně Chirobiotic T při složení optimalizované mobilní fáze methanol/1 % TEAA, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 254 nm, teplota 25 °C. Označení: A – theanin, B – valin, C – leucin, D – isoleucin, E – alanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer, 3 – Dns-Cl.

**Tab. 16** Vliv koncentrace pufru na retenci a separaci Dns-DL-aminokyselin. Separální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v) a methanol/0,5 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 35/75 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 254 nm, teplota 25 °C.

Koncentrace pufru [%]	$k_L$	$k_D$	$\alpha_{DL}$	$R_{DL}$
<b>DL-Theanin</b>				
<b>1,0</b>	0,55	1,04	1,89	2,82
<b>0,5</b>	0,55	1,00	1,82	2,14
<b>DL-Valin</b>				
<b>1,0</b>	0,96	1,12	1,17	0,81
<b>0,5</b>	0,91	1,06	1,16	0,74
<b>DL-Leucin</b>				
<b>1,0</b>	0,51	0,71	1,39	1,28
<b>0,5</b>	0,53	0,74	1,40	1,44
<b>DL-Izoleucin</b>				
<b>1,0</b>	0,52	0,67	1,30	0,89
<b>0,5</b>	0,54	0,69	1,28	1,02
<b>DL-Alanin</b>				
<b>1,0</b>	0,44	0,56	1,27	0,82
<b>0,5</b>	0,45	0,57	1,27	1,00

### **3.6.2.2 Kalibrační závislost Dns-DL-theaninu**

Za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), detekce v UV oblasti (254 nm) a fluorescenčně (vlnová délka excitace/emise 340/516 nm) byla na koloně Chirobiotic T proměřena kalibrační závislost ploch a výšek píků na koncentraci dansylderivátů D- a L-theaninu.

Kalibrační roztoky pro UV detekci byly získány následujícím způsobem. DL-theanin byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci 1 mg/ml. Ke 100  $\mu$ l roztoku aminokyseliny bylo přidáno 60  $\mu$ l 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> o pH 9,5 a 60  $\mu$ l dansylchloridu o koncentraci 20 mg/ml rozpuštěného v acetonitrilu. Reakce probíhala 14 hodin při laboratorní teplotě a byla zastavena přidávkem 40  $\mu$ l kyseliny octové. Pro dosažení potřebných koncentrací ke kalibraci byl tento zásobní roztok ředěn destilovanou vodou.

Pro detekci v UV oblasti byly proměřeny koncentrace Dns-DL-theaninu v rozmezí 0,005-0,04 mg/ml, což odpovídá koncentracím 0,0025-0,02 mg/ml pro jednotlivé enantiomery. Pro fluorimetrickou detekci byly proměřeny koncentrace Dns-DL-theaninu v rozmezí 0,03-0,13 mg/ml, což odpovídá koncentracím 0,015-0,065 mg/ml pro jednotlivé enantiomery. Na každé koncentrační hladině bylo měření provedeno třikrát. Závislosti odezvy na koncentraci byly zpracovány pomocí lineární regrese.

Ze získaných regresních rovnic závislosti výšky píků na koncentraci dansylderivátů byly následně vypočteny limity detekce a stanovitelnosti. Výsledné koeficienty rovnic pro plochy a výšky píků jsou uvedeny v Tabulkách 17 a 18 společně s příslušnými limity detekce a stanovitelnosti.

Z naměřených limitů detekce a stanovitelnosti je patrný soulad s literaturou, kde bylo uvedeno, že fluorescenční detekce dansylderivátů aminokyselin není tak citlivá jako detekce v UV oblasti spektra. Důvodem je obrovská odezva píku derivatizačního činidla při fluorescenční detekci, který svou velikostí zastiňuje píky derivátů aminokyselin.

**Tab. 17** Koeficienty regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti enantiomerů theaninu derivatizovaných dansylchloridem. Separační podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, UV detekce 254 nm, teplota 25 °C.

<b>L-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$1,13 \cdot 10^6$	$2,29 \cdot 10^2$	0,9975
<b>Plocha píku</b>	$2,02 \cdot 10^7$	$1,06 \cdot 10^4$	0,9967
<b>LOD</b>	17,7 ng/ml		
<b>LOQ</b>	59,1 ng/ml		
<b>D-theanin</b>			
	Směrnice [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$7,72 \cdot 10^5$	$1,44 \cdot 10^2$	0,9970
<b>Plocha píku</b>	$1,87 \cdot 10^7$	$9,90 \cdot 10^3$	0,9969
<b>LOD</b>	25,9 ng/ml		
<b>LOQ</b>	86,5 ng/ml		

**Tab. 18** Koeficienty regresní rovnice, koeficienty determinace a limity detekce a stanovitelnosti enantiomerů theaninu derivatizovaných dansylchloridem. Separační podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min, fluorescenční detekce excitace/emise 340/516 nm.

<b>L-theanin</b>			
	Směrnice [ $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\text{mV}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$8,63 \cdot 10^5$	$-3,69 \cdot 10^3$	0,9976
<b>Plocha píku</b>	$2,22 \cdot 10^7$	$-1,17 \cdot 10^5$	0,9939
<b>LOD</b>	0,584 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<b>LOQ</b>	1,95 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<b>D-theanin</b>			
	Směrnice [ $\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{ml}$ ]	Úsek [ $\text{mV}\cdot\text{s}$ ]	R
<b>Výška píku</b>	$6,06\text{e}+005$	$2,5\text{e}+003$	0,9947
<b>Plocha píku</b>	$1,91\text{e}+007$	$-1,2\text{e}+005$	0,9943
<b>LOD</b>	0,832 $\mu\text{g}/\text{ml}$		
<b>LOQ</b>	2,77 $\mu\text{g}/\text{ml}$		

### 3.6.2.3 Porovnání derivatizačních činidel

Po optimalizaci derivatizačních reakcí a složení mobilních fází byly porovnány výsledky získané pro dvě derivatizační činidla, dansylchlorid a 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chlorid.

Bylo zjištěno, že vlivem dlouhých retenčních časů FMOC-D-enantiomerů aminokyselin docházelo k rozmývání a s tím spojené asymetrii jejich píků. Právě dlouhé retenční časy u derivátů FMOC-Cl pomohly k podstatně lepšímu rozlišení píků jednotlivých enantiomerů, zatímco vlivem krátkých retenčních časů u derivátů dansylchloridu docházelo ke koeluci enantiomerů aminokyselin. Důležitá však byla separace enantiomerů theaninu, u kterých ke koeluci nedocházelo.

Limity detekce a stanovitelnosti byly zjištěny při detekci v UV oblasti i fluorescenčně (Tab. 19). Výsledky byly v souladu s literaturou, tzn. detekční limity se při fluorescenční detekci snížily u derivátů FMOC-Cl<sup>33</sup>, zatímco u derivátů dansylchloridu se výrazně zhoršily.<sup>44</sup>

Detekční limity naměřené v UV oblasti pro L-theanin byly poněkud nižší při derivatizaci pomocí FMOC-Cl, ale u D-theaninu to bylo naopak. Tento rozdíl byl způsoben podstatně delším retenčním časem FMOC-D-theaninu, jehož pík se rozmýval. Při použití jiné mobilní fáze s vyšší eluční silou by s největší pravděpodobností byl limit detekce FMOC-D-theaninu nižší než u derivátu dansylchloridu.

Z těchto výsledků je patrné, že pro stanovení theaninu je jako derivatizační činidlo vhodnější FMOC-Cl, protože při jeho použití je možné detekovat theanin v řádech ng/ml při detekci v UV oblasti spektra a fluorescenčně až desetiny ng/ml.

Derivatizační metody optimalizované v této práci jsou podle zjištěných limitů detekce a stanovitelnosti pro deriváty theaninu citlivější, než metody použité v dříve publikované studii<sup>7</sup>, kde byla použita stejná derivatizační činidla.

**Tab. 19** Porovnání limitů detekce a stanovitelnosti FMOC- a Dns-derivátů theaninu naměřených na koloně Chirobiotic T za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze methanol/1 % TEAA, pH 6,0 v objemovém poměru 32:68, resp. 40:60, průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce v UV oblasti 262 nm, resp. 254 nm, fluorescenční detekce excitace/emise 254/314 nm, resp 340/516 nm.

<b>Deriváty theaninu</b>	<b>LOD [ng/ml]</b>	<b>LOQ [ng/ml]</b>
<b>UV detekce</b>		
<b>FMOC-L-theanin</b>	9,50	31,7
<b>FMOC-D-theanin</b>	37,7	126
<b>Dns-L-theanin</b>	17,7	59,1
<b>Dns-D-theanin</b>	25,9	86,5
<b>Fluorescenční detekce</b>		
<b>FMOC-L-theanin</b>	0,755	2,52
<b>FMOC-D-theanin</b>	4,26	14,2
<b>Dns-L-theanin</b>	584	1950
<b>Dns-D-theanin</b>	832	2770

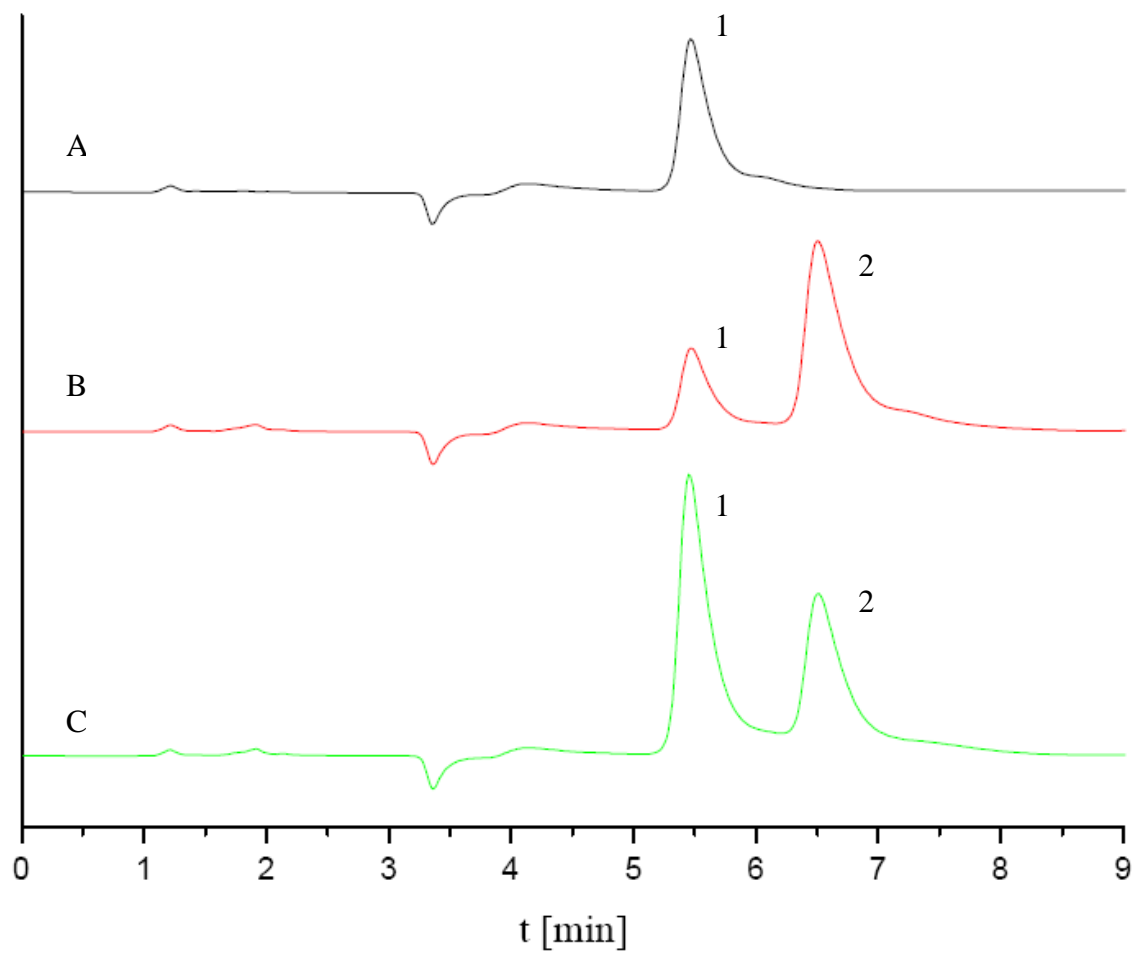
### **3.6.3 Analýza potravinového doplňku obsahujícího L-theanin**

V literatuře bylo již dříve publikováno, že některé potravinové doplňky na bázi L-theaninu obsahovaly racemát obou enantiomerů, i když by měly obsahovat pouze L-enantiomer. Proto byla za optimalizovaných podmínek zjištěných v této práci pro separaci nederivatizovaných aminokyselin (v mobilní fázi methanol/voda 60/40 (v/v) při vlnové délce 205 nm) na koloně Chirobiotic T provedena analýza tablety L-Theaninu rozpuštěné ve vodě, jestli se v ní také nevyskytuje příměs D-enantiomeru. Výsledky ukázaly, že se v této tabletě D-theanin nevyskytuje, což bylo potvrzeno přidavkem D- i L-enantiomerů (Obr. 12).

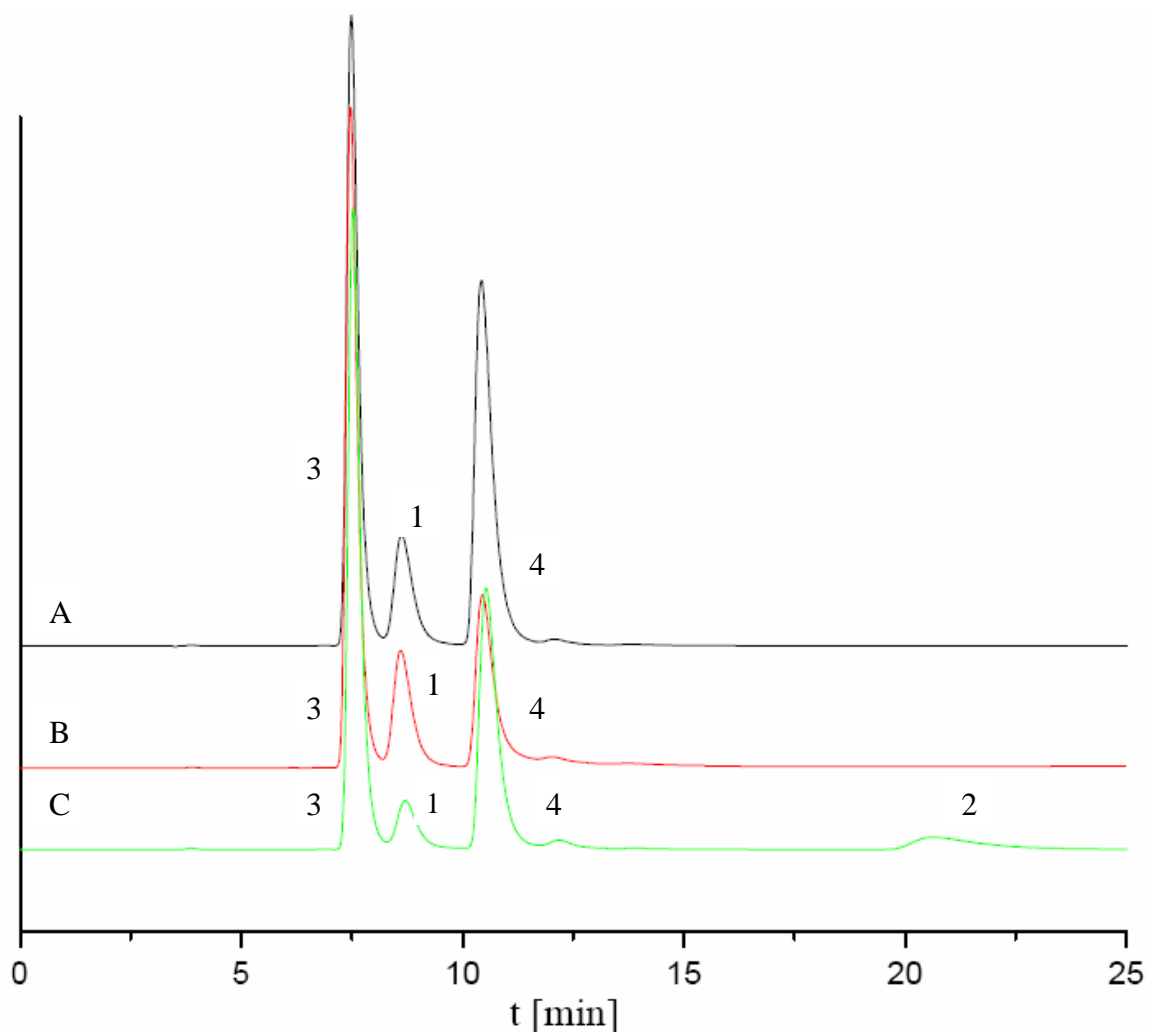
Je však pravděpodobné, že tato separační metoda nebyla dostatečně účinná, aby odhalila velmi malou koncentraci D-enantiomeru. Proto byla následně na stejné koloně provedena analýza za optimalizovaných separačních podmínek po derivatizaci pomocí FMOC-Cl (v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), vlnová délka detekce 262 nm) (Obr. 13) a po derivatizaci dansylchloridem (v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), vlnová délka detekce 254 nm), (Obr. 14). Ani těmito postupy nebyla zjištěna příměs D-enantiomeru, což bylo opět potvrzeno přidavkem obou enantiomerů.

Z těchto výsledků je patrné, že se v tomto potravinovém doplňku D-theanin nevyskytuje, nebo je zde přítomen v tak malém množství, které není možné těmito metodami detekovat.

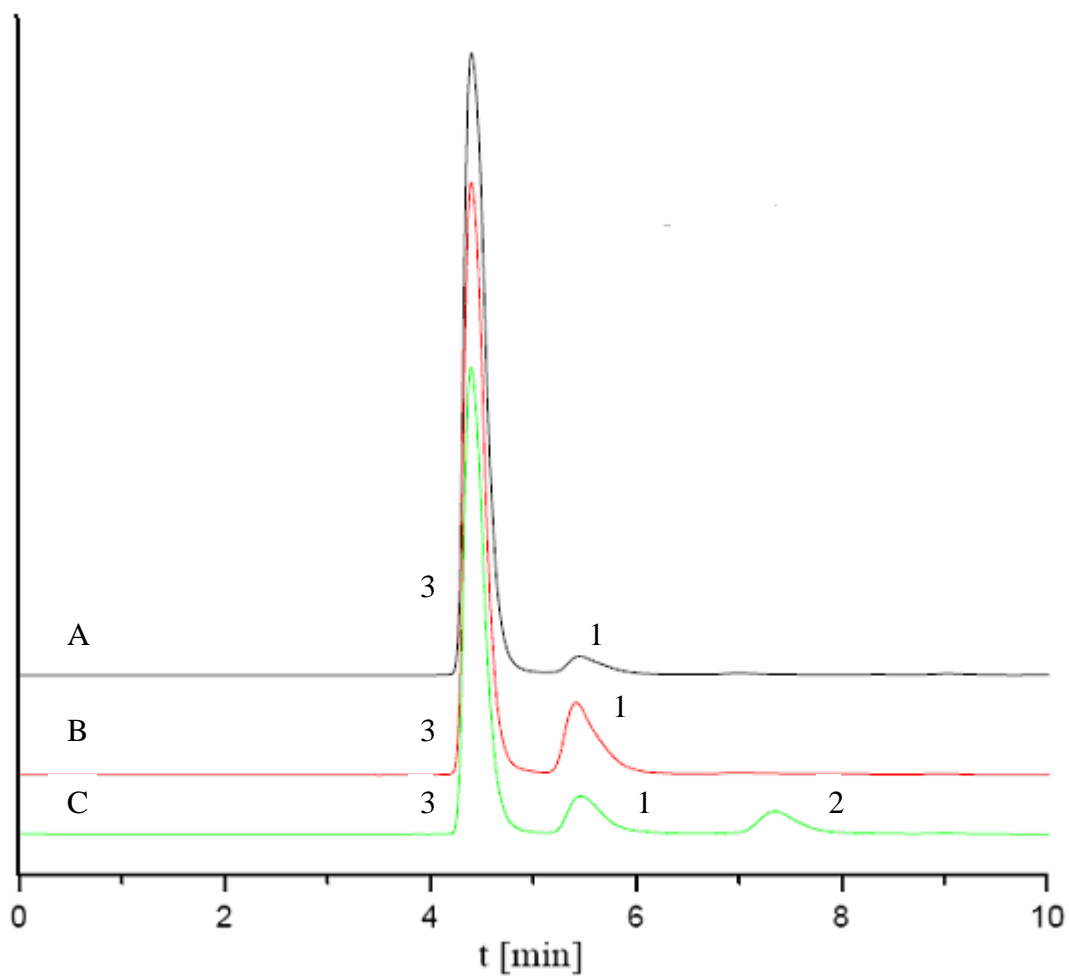




**Obr. 12** Analýza potravinového doplňku obsahujícího theanin bez derivatizace na koloně Chirobiotic T v mobilní fázi methanol/voda 60/40 (v/v), vlnová délka detekce 205 nm, průtok 1 ml/min a teplota 25 °C. Označení: A – tableta, B – tableta + D-theanin, C – tableta + DL-theanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.



**Obr. 13** Analýza potravinového doplňku obsahujícího theanin po derivatizaci FMOC-Cl na koloně Chirobiotic T, v mobilní fázi methanol/1 % TEAA, pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 262 nm a teplota 25 °C. Označení: A – FMOC-tableta, B – FMOC-tableta + FMOC-L-theanin, C – FMOC-tableta + FMOC-D-theanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer, 3 – FMOC-Cl, 4 – FMOC-OH.



**Obr. 14** Analýza potravinového doplňku obsahujícího theanin po derivatizaci dansylchloridem na koloně Chirobiotic T v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 254 nm a teplota 25 °C. Označení: A – Dns-tableta, B – Dns-tableta + Dns-L-theanin, C – Dns-tableta + Dns-DL-theanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer, 3 – Dns-Cl.

## **3.6.4 Analýza zeleného čaje**

### **3.6.4.1 Důkaz přítomnosti theaninu v čaji**

Přítomnost a obsah theaninu byly analyzovány v zeleném čaji Leros Millenium Exclusive. Pro důkaz přítomnosti theaninu byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (HPLC/ESI-MS). Vzorky čaje byly připraveny podle literatury.<sup>59</sup>

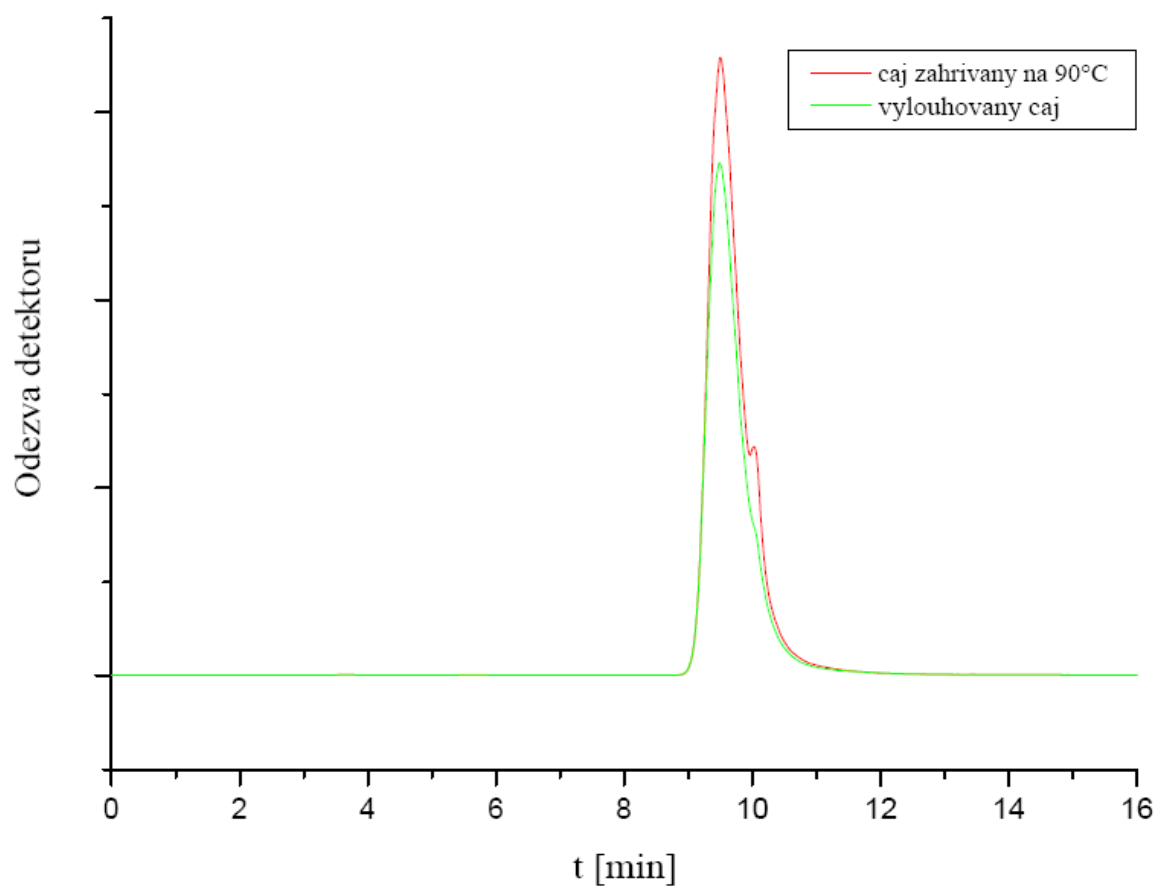
Byly připraveny dva vzorky čaje, každý odlišným způsobem. Detailní popis přípravy je popsán v kapitole 3.4. Vzorky byly analyzovány na koloně Chirobiotic T v mobilní fázi methanol/voda 70/30 (v/v) při vlnové délce 205 nm a průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min.

V obou vzorcích čaje byla zjištěna pouze přítomnost L-theaninu, D-theanin detekován nebyl (Obr. 15). Je však možné, že jeho množství v čaji bylo pod limitem detekce, a proto nebylo možné určit jeho přítomnost.

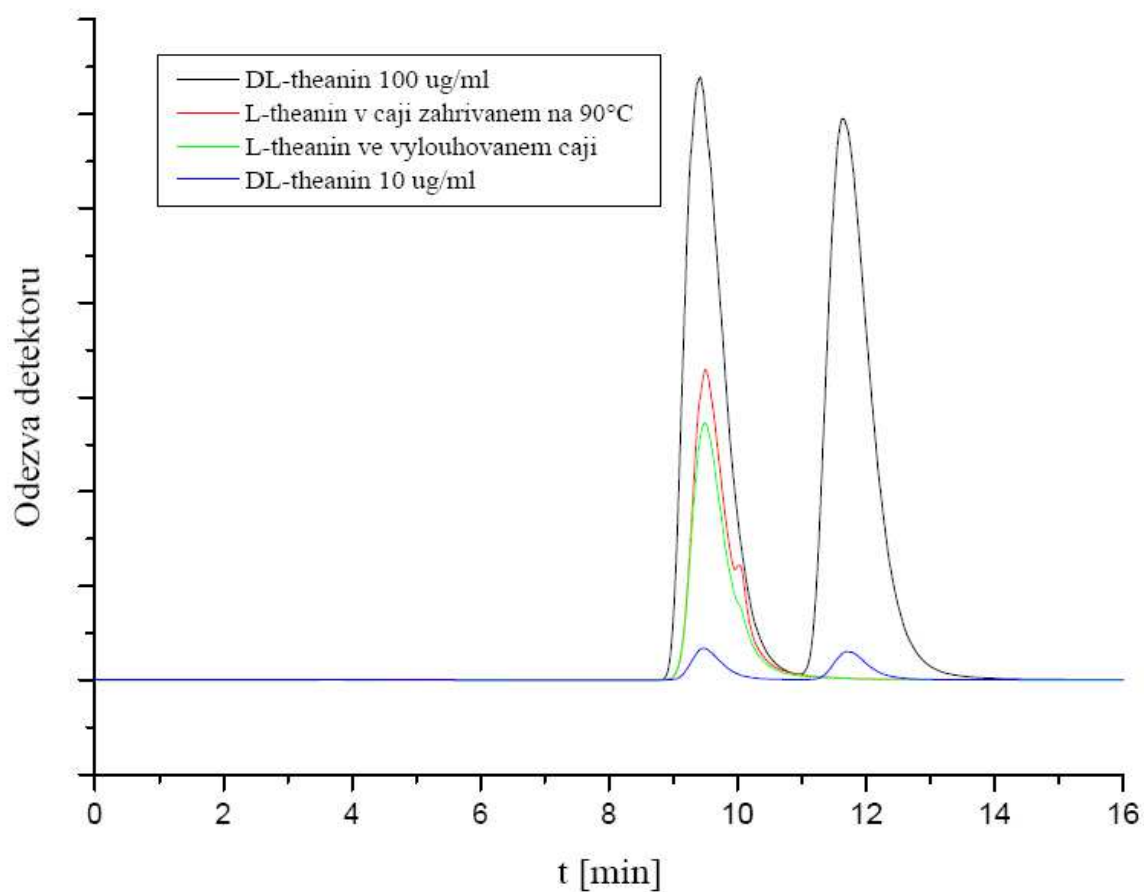
Dále je velice pravděpodobné, že naměřené píky nejsou tvořeny pouze theaninem, ale také dalšími aminokyselinami o stejné molekulové hmotnosti přítomnými v čaji, které eluují se stejným retenčním časem. Na Obrázku 15 jsou jasně viditelné „zoubky“ na obou chromatogramech, které signalizují přítomnost dalších látek.

Pro hrubý odhad koncentrace theaninu v čaji byly touto metodou analyzovány dva standardy DL-theaninu o koncentracích 100 a 10 µg/ml (tzn. 50 a 5 µg/ml jednotlivých enantiomerů). (Obr. 16) Na základě této dvoubodové kalibrace byly u obou vzorků čaje vypočítány koncentrace L-theaninu. Koncentrace ve vylouhovaném čaji byla přibližně 18,0 µg/ml a koncentrace v čaji zahříváném na 90 °C byla přibližně 21,9 µg/ml. Z tohoto výsledku je patrné, že theanin se z čajových lístků louhuje do vody velice snadno již po zalití a ani zvýšená teplota nijak výrazně neovlivní jeho uvolněné množství.

Podle těchto výsledků bychom v šálku tohoto zeleného čaje o obvyklém objemu 200 ml a hmotnosti čajových lístků v sáčku 2 g našli přibližně 7,2 µg/ml L-theaninu.



**Obr. 15** Chromatogramy analyzovaných vzorků zeleného čaje na koloně Chirobiotic T v mobilní fázi methanol/destilovaná voda v poměru 70/30 (v/v), průtok 0,5 ml/min a teplota 25 °C, naměřené za použití hmotnostního detektoru.



**Obr. 16** Chromatogramy analyzovaných vzorků zeleného čaje a standardů na koloně Chirobiotic T v mobilní fázi methanol/destilovaná voda v poměru 70/30 (v/v), průtok 0,5 ml/min a teplota 25 °C, naměřené za použití hmotnostního detektoru.

### **3.6.4.2 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji optimalizovanými metodami bez a za použití derivatizace**

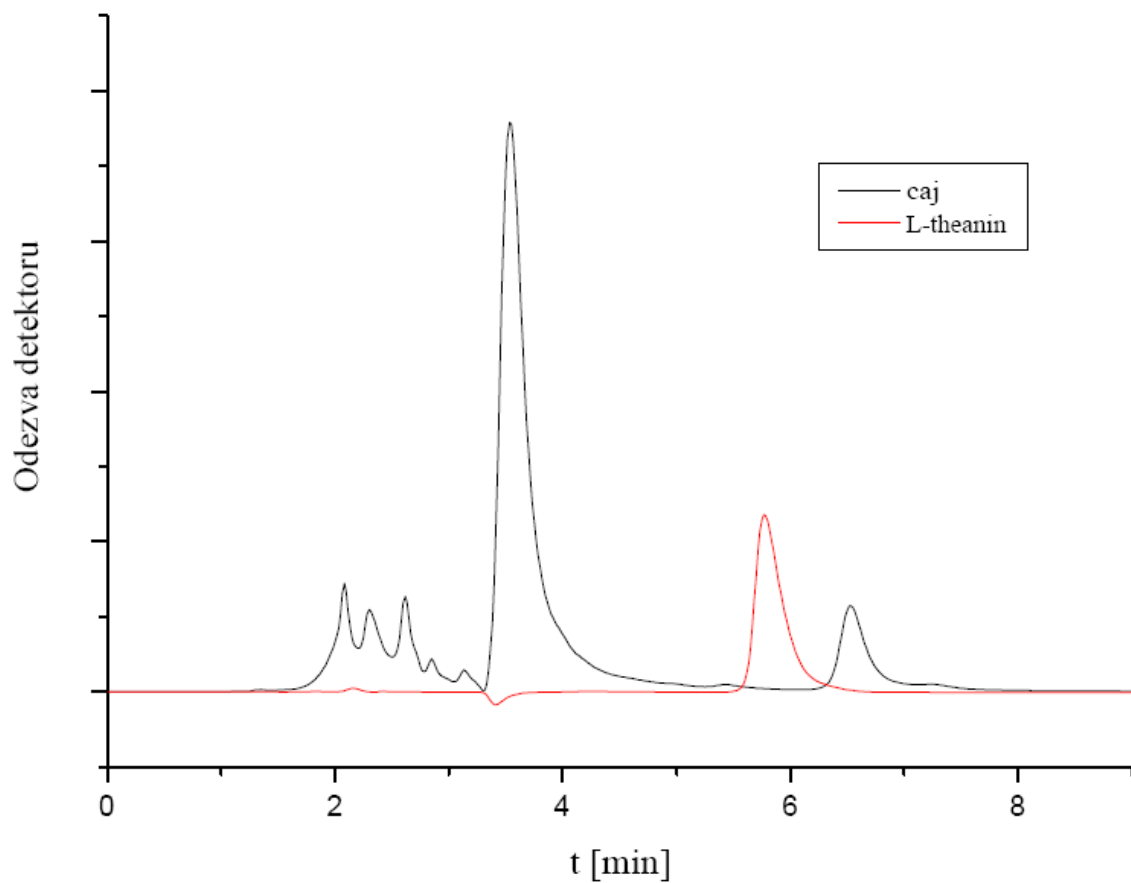
Byly provedeny analýzy vzorků zeleného čaje bez a za použití derivatizace. K separaci theaninu byly použity metody optimalizované v této práci.

Vzorky použité pro důkaz přítomnosti theaninu v čaji byly analyzovány v nederivatizované podobě a dále pomocí derivatizace dansylchloridem a 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridem.

#### **3.6.4.2.1 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji bez derivatizace**

Protože ve vzorcích připravovaných pro hmotnostní detekci (příprava vzorku viz kapitola 3.4) nebyla detekována přítomnost theaninu optimalizovanou metodou pro nederivatizované aminokyseliny, tj. kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnová délka detekce 205 nm, průtok 1 ml/min, teplota 25 °C, bylo nutné připravit vzorek čaje s vyšší koncentrací theaninu.

Při přípravě tohoto nového vzorku bylo 1,9 g čaje zalito 20 ml vřící užitkové vody. Směs byla ponechána 20 minut v klidu při laboratorní teplotě a následně byla přefiltrována. V optimalizované mobilní fázi methanol/voda byl detekován pouze jeden pík, který se však svou retencí neshodoval s píkem theaninu, což bylo potvrzeno přidávkem L-theaninu (Obr. 16). Z výsledku je patrné, že tato metoda analýzy aminokyselin bez použití derivatizace není dostatečně citlivá, aby jí bylo možné detekovat theanin v čaji.



**Obr. 16** Chromatogramy analýzy nederivatizovaného vzorku čaje a standardu theaninu naměřené na koloně Chirobiotic T za optimalizovaných podmínek. Mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), vlnová délka detekce 205 nm, průtok 1 ml/min, teplota 25 °C.



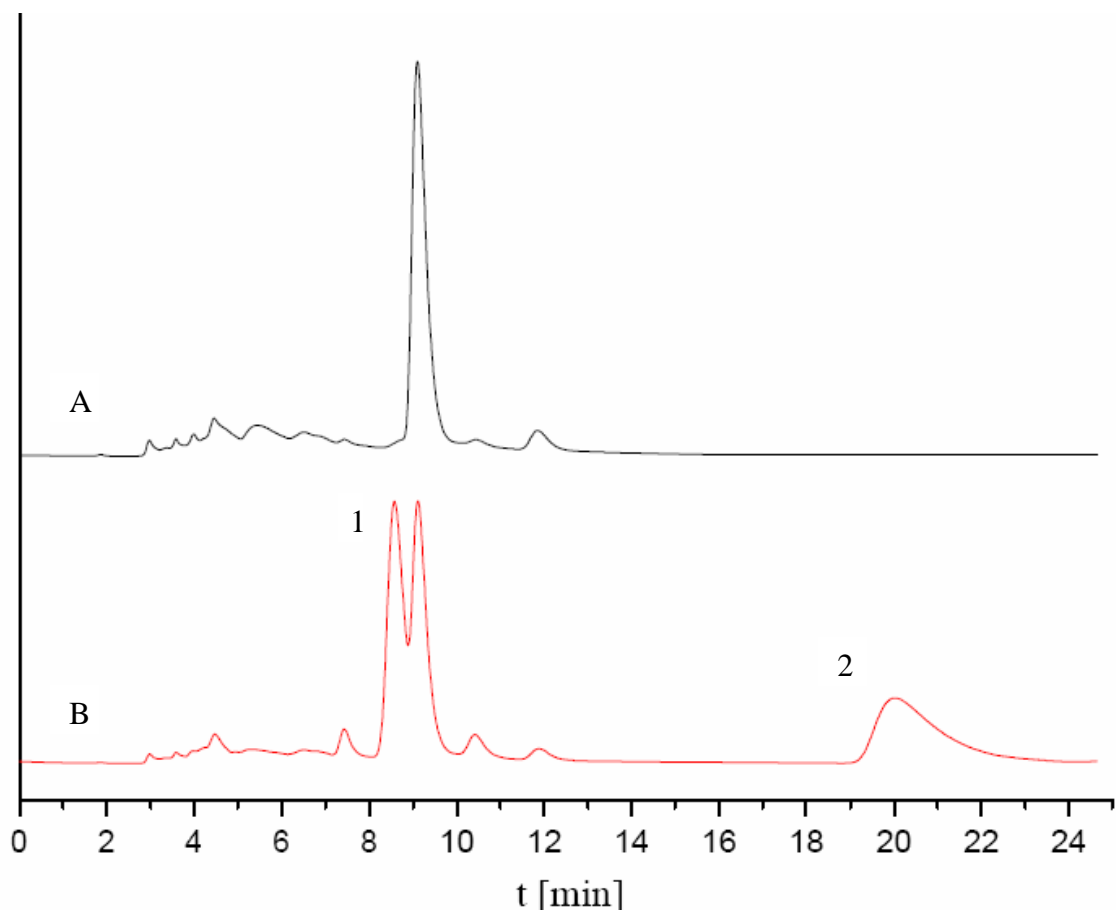
### **3.6.4.2.2 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji po derivatizaci FMOC-Cl**

Derivatizace vzorků připravených pro hmotnostní detekci (příprava vzorku viz kapitola 3.4) probíhala následujícím způsobem. Bylo smícháno 100  $\mu$ l čaje, 100  $\mu$ l roztoku FMOC-Cl o koncentraci 0,5 mg/ml a směs byla důkladně promíchána a 20 minut ponechána v klidu při laboratorní teplotě. V těchto vzorcích optimalizovanou metodou (kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 262 nm, teplota 25 °C) nebyla detekována přítomnost theaninu.

Z tohoto důvodu byl analyzován také koncentrovanější vzorek čaje připravený stejně jako pro analýzu bez derivatizace. 100  $\mu$ l filtrátu čaje bylo smícháno se 100  $\mu$ l FMOC-Cl koncentraci 0,5 mg/ml a směs byla po důkladném promíchání ponechána 20 minut v klidu. Vzorek byl analyzován za výše popsaných optimalizovaných podmínek.

Na chromatogramu byly zaznamenány dva píky derivatizačního činidla a jeden pík uprostřed nich, který se však retenčním časem neshodoval s L-theaninem. Proto byl derivatizovaný vzorek čaje 10 x naředěn pro získání menší odezvy a potřepán se 2 ml pentanu pro odstranění píků derivatizačního činidla. Následně byl tento roztok přidán v poměru 1:1 k FMOC-DL-theaninu rozpuštěnému ve vodě o koncentraci 0,1 mg/ml protřepanému pentanem.

Z Obrázku 17 je patrné, že pík pocházející z analýzy čaje nepatří L-theaninu, i když by podle retenčního času mohl být částečně tvořen směsí několika L-enantiomerů aminokyselin přítomných v čaji. Touto metodou tedy nebylo možné stanovit přítomnost theaninu.

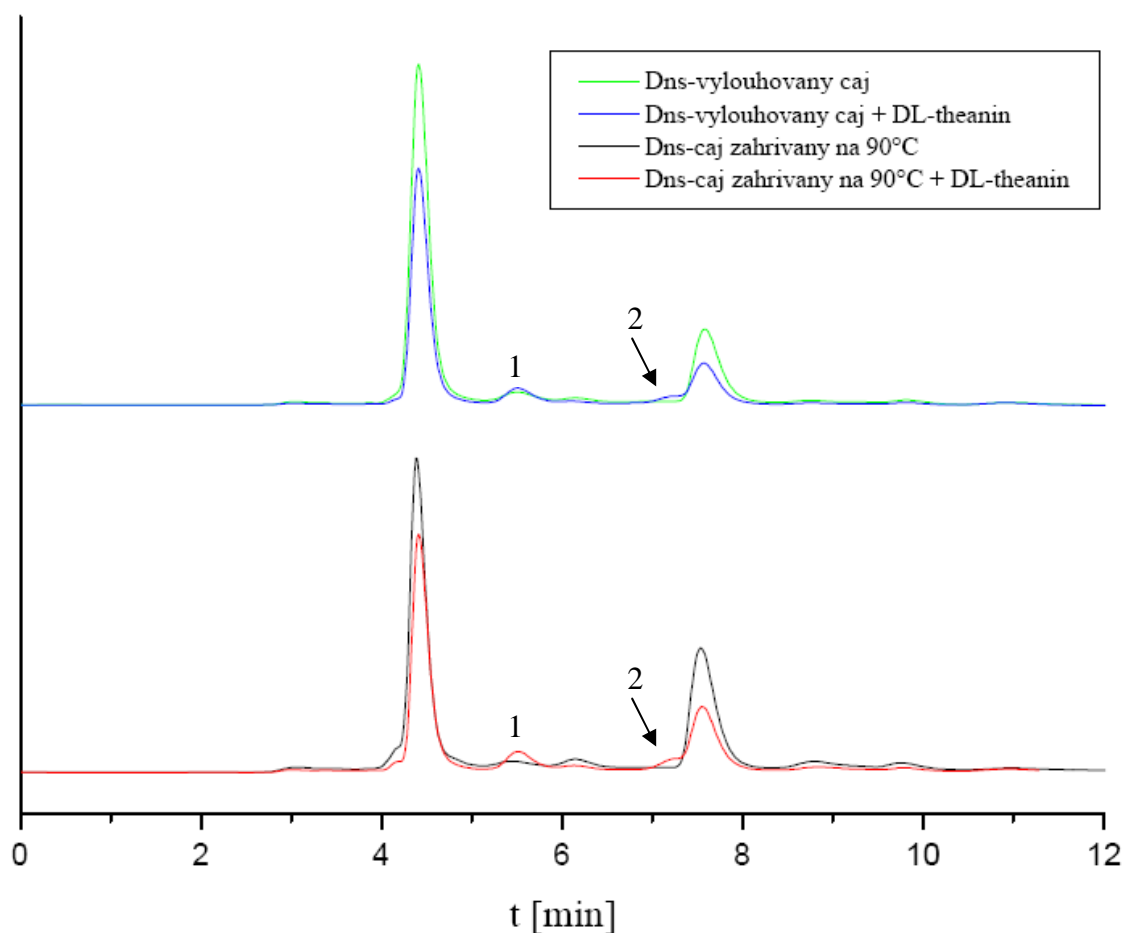


**Obr. 17** Chromatogramy analýzy vzorku čaje derivatizovaného FMOC-Cl a stejného vzorku s přidavkem FMOC-DL-theaninu naměřené na koloně Chirobiotic T za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 262 nm, teplota 25 °C. Označení: A – FMOC-čaj, B – FMOC-čaj + FMOC-DL-theanin; 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.

### 3.6.4.2.3 Stanovení přítomnosti theaninu v čaji po derivatizaci dansylchloridem

Při derivatizaci dansylchloridem byla analyzována přítomnost theaninu ve vzorcích čaje připravených stejně jako pro analýzu s hmotnostní detekcí (příprava vzorku viz kapitola 3.4) za optimalizovaných podmínek (kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr o pH 6,0 v poměru 40/60 (v/v), při průtoku 1 ml/min, vlnové délce detekce 254 nm a teplotě 25 °C).

Na Obrázku 18 jsou znázorněny chromatogramy analýz vylouhovaného a zahříváného vzorku čaje společně s přidavky DL-theaninu. Z chromatogramů je patrné, že za použití tohoto derivatizačního činidla byl detekován theanin.



**Obr. 18** Chromatogramy analýzy vzorků čaje derivatizovaných dansylchloridem a s přidavky Dns-DL-theaninu naměřené na koloně Chirobiotic T za optimalizovaných podmínek v mobilní fázi methanol/1 % TEAA pufr, pH 6,0 v poměru 32/68 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 254 nm, teplota 25 °C. Označení: 1 – L-enantiomer, 2 – D-enantiomer.

#### **3.6.4.2.4 SPE prekoncentrace theaninu v čaji**

Prekoncentrace theaninu byla provedena podle popisu předchozího stanovení na kolonkách SCX<sup>54</sup>, MerckLiChrolut RP-18<sup>59</sup>. Po nadávkování theaninu byly proteklé frakce analyzovány za optimalizovaných podmínek (mobilní fáze methanol/voda 60/40 (v/v), průtok 1 ml/min, vlnová délka detekce 205 nm) na koloně Chirobiotic T.

Bylo zjištěno, že z kolonky SCX se theanin vůbec nevymýval a na kolonce RP-18 docházelo pouze k minimálnímu zachycování L-theaninu, většina nadávkovaného množství protékala i při nízkých koncentracích.

Byla porovnána odezva dansylovaného theaninu ve vzorcích čaje s a bez prekoncentrace na pevné fázi. Theanin uvolněný z čajových lístků byl oddělen od polyfenolů pomocí kolonky RP-18 pouze nanesením 1 ml vzorku čaje a následným vymytím 5 ml 10 % ethanolu, jak bylo popsáno v literatuře.<sup>59</sup> Výsledný eluát byl odpařen do sucha, rozpuštěn v 0,5 ml destilované vody a filtrován přes 0,45 µm nylonový filtr před samotnou derivatizací.

Derivatizační směsi se skládaly ze 100 µl čaje, 60 µl dansylchloridu a 60 µl 0,2 M NaHCO<sub>3</sub> o pH 9,5. Vzorky byly důkladně promíchány a ponechány v klidu při laboratorní teplotě po dobu 14 hodin. Reakce byla zastavena přidávkem 40 µl kyseliny octové. Všechny čtyři vzorky (čaj vylouhovaný, čaj zahříváný na 90 °C a jejich prekoncentrované analogy) byly analyzovány za optimalizovaných podmínek (kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/1 % TEAA pufr o pH 6 v poměru 40/60 (v/v) při průtoku 1 ml/min, vlnové délce detekce 254 nm a teplotě 25 °C).

Výsledky jsou zatím předběžné a ještě nepotvrdily nutnost prekoncentrace theaninu.

## 4. Závěr

Náplní této práce bylo nalézt a optimalizovat metody separace enantiomerů theaninu na dvou chirálních stacionárních fázích na bázi teikoplaninu a porovnat stanovení enantiomerů bez a s použitím derivatizace 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridem a dansylchloridem. Pro porovnání byly též analyzovány enantiomery několika dalších aminokyselin – valinu, leucinu, isoleucinu a alaninu. Bylo obvyklé, že především L-enantiomery studovaných aminokyselin eluovaly v podobných časech. Po optimalizaci separačních systémů a postupů derivatizace byly u každé metody zjištěny limity detekce a stanovitelnosti pro oba enantiomery theaninu. Optimalizovanými metodami byl následně analyzován theanin v čaji a ve vybraném potravinovém doplňku.

Separace bez derivatizace probíhala na kolonách s navázaným teikoplaninem a teikoplaninem aglykonem. Bylo zjištěno, že kolona Chirobiotic TAG více zadržuje aminokyseliny, především jejich D-enantiomery, a proto poskytuje lepší rozlišení.

Vlivem dlouhých retenčních časů byly limity detekce a stanovitelnosti L-theaninu na koloně Chirobiotic TAG poněkud vyšší než na koloně Chirobiotic T. Limit detekce na koloně s navázaným teikoplaninem byl 0,255  $\mu\text{g/ml}$  a na koloně s navázaným teikoplaninem aglykonem byl 0,332  $\mu\text{g/ml}$ .

Limity detekce a stanovitelnosti pro derivatizované aminokyseliny byly zjištěny při detekci v UV oblasti i fluorescenčně. V souladu s literaturou se detekční limity při fluorescenční detekci podstatně snížily u derivátů FMOC-Cl až na desetiny  $\text{ng/ml}$ , zatímco u derivátů dansylchloridu se zhoršily na desetiny  $\mu\text{g/ml}$ . Detekční limity pro L-theanin naměřené u UV oblasti byly o něco málo nižší při derivatizaci pomocí FMOC-Cl, ale u D-theaninu to bylo naopak.

Z výsledků je patrné, že pro stanovení theaninu je jako derivatizační činidlo vhodnější FMOC-Cl, protože při jeho použití bylo možné detekovat theanin v řádech nanogramů při detekci v UV oblasti spektra a fluorescenčně až desetiny  $\text{ng/ml}$ .

Při analýze vzorku zeleného čaje za použití hmotnostní detekce byla zjištěna pouze přítomnost L-theaninu, D-enantiomer detekován nebyl. Je však pravděpodobné, že jeho množství bylo pod limitem detekce. Je totiž běžné, že se v čajích vyskytuje malé množství D-theaninu, podle literatury až 10% z celkového množství theaninu. Množství tohoto enantiomeru pak může být významným ukazatelem kvality čaje. Velmi nízké

množství D-theaninu v tomto čaji svědčí o tom, že nebyl vystaven žádným nevhodným podmínkám.

Orientačním měřením provedeným za účelem přibližného stanovení množství theaninu v zeleném čaji bylo zjištěno, že v šálku o obvyklém objemu 200 ml a hmotnosti čajových lístků v sáčku 2 g je přítomno přibližně 7,2 µg/ml L-theaninu.

Dále byla přítomnost theaninu v čaji analyzována pomocí optimalizovaných metod bez a za pomoci derivatizace. Metodou bez derivatizace ani po derivatizaci 9-fluorenylmethyloxykarbonyl chloridem nebylo možné theanin detekovat. Theanin byl detekován pouze za použití dansylchloridu jako derivatizačního činidla.

Výsledek analýzy potravinového doplňku na bázi L-theaninu ukázal, že ani jednou z optimalizovaných metod nebyla zjištěna přítomnost D-theaninu, což bylo potvrzeno přidavkem tohoto enantiomeru. Toto zjištění je poměrně důležité, neboť metabolické dráhy D-theaninu ještě nebyly detailně prozkoumány a není jisté, jestli by jeho konzumace ve větším množství neměla za následek zdravotní komplikace.

## **5. Použitá literatura:**

- <sup>1</sup> P. Anzenbacher, J. Jezdinský; *Klin Farmakol Farm* 17 (2003) 148–150
- <sup>2</sup> J. Kroutil: *Problémy ve stereochemii uhlíkatých sloučenin*, převzato dne 18.3.2012 z <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/27kroutil.pdf>
- <sup>3</sup> P. Repko, *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2011
- <sup>4</sup> O. Červinka; *Chem. listy* 93 (1999) 294–305
- <sup>5</sup> E. Tesařová: *Analýza chirálních sloučenin*, kapitoly 2 a 4, Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007
- <sup>6</sup> G. Subramanian: *Chiral separation techniques: a practical approach*, Wiley-VCH 2007, Weinheim, Německo, str. XVII, 1-2
- <sup>7</sup> M. J. Desai, D. W. Armstrong; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 251-256
- <sup>8</sup> Z. Friedl: *Organická chemie I – Stereochemie*, studijní materiály pro studenty Ústavu chemie a technologie ochrany životního prostředí, převzato dne 18.3.2012 z [http://www.fch.vutbr.cz/ictep/studijni\\_materialy/Organicka\\_chemie\\_1\\_pr/04%20Stereochemie.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/ictep/studijni_materialy/Organicka_chemie_1_pr/04%20Stereochemie.pdf)
- <sup>9</sup> M. Oravec, *Diplomová práce*, Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii, 2006
- <sup>10</sup> G. B. Baker, S. Dunn, A. Holt: *Handbook of Neurochemistry And Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Methods*, Svazek 6, Springer 2007, str. 21-22
- <sup>11</sup> Z. Bosáková: *Chirální separace*, skripta Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek, Praha 2006, převzato dne 18.3.2012 z <http://www.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/separace.pdf>
- <sup>12</sup> I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 1-15
- <sup>13</sup> M. W. Dong: *Modern HPLC for practicing scientists*, John Wiley and sons, Inc. 2006, str. 87-88
- <sup>14</sup> Jan Šíma: *Separační metody v analytické chemii*, materiál pro studenty, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, převzato dne 18.3.2012 z [http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka\\_chemie/separa.htm](http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm)
- <sup>15</sup> F. Opekar, I. Jelínek, P. Rychnovský, Z. Plzák: *Základní analytická chemie*, Karolinum 2007, str. 167-168
- <sup>16</sup> M. Douša: *Typy detektorů v HPLC*, převzato dne 18.3.2012 z <http://www.hplc.cz/Teorie/detectors.html>

- <sup>17</sup> M. Douša: *Derivatizační techniky v HPLC*, převzato 29.1.2012 z <http://www.hplc.cz/Der/>
- <sup>18</sup> J. Novák: *Diplomová práce, České vysoké učení technické v Praze, Fakulta elektrotechnická*, 2008
- <sup>19</sup> L.H. Easson, E. Stedman; *Biochem. I.*, 27 (1933) 1257-66
- <sup>20</sup> A. Berthod: *Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, str. 155-156
- <sup>21</sup> C.H. Lochmüller, R.W. Souter; *J. Chromatogr. A* 113 (1975) 283-302
- <sup>22</sup> I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, M. Pierini, C. Villani; *Adv. Chromatogr.*, 46 (2005) 109-174
- <sup>23</sup> T. J. Ward, A. B. Farris; *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 73
- <sup>24</sup> A. Berthold, B. L. Heb, T. E. Beesley; *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 205-214
- <sup>25</sup> J. Lokajová, E. Tesařová, D. W. Armstrong; *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 57-66
- <sup>26</sup> M. Haroun, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E Peyrin; *Talanta* 68 (2006) 1032–1036
- <sup>27</sup> R.M. Callejón, A.M. Troncoso, M.L. Morales; *Talanta* 81 (2010) 1143-1152
- <sup>28</sup> M. Douša: *Derivatizační techniky v HPLC*, převzato 29.1.2012 z <http://www.hplc.cz/Der/>
- <sup>29</sup> J. F. Lawrence; *J. Chromatogr. Sci.* 17 (1979) 147-151
- <sup>30</sup> M. Douša: *Stanovení aminokyselin v krmivech*, převzato 29.1.2012 z <http://hplc1.sweb.cz/Amk/amk.htm>
- <sup>31</sup> S. Einarsson, B. Josefsson, S. Lagerkvist; *J. Chromatogr.* 282 (1983) 609-618
- <sup>32</sup> Einarsson S.B., Josefsson B., Lagerkvist S.: *J. Chromatogr.* 282 (1983) 609
- <sup>33</sup> I. Molnár-Perl; *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 1241-1269
- <sup>34</sup> A. Jámboř, I. Molnár-Perl; *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3064-3077
- <sup>35</sup> L.A. Schilb, V.D. Fiegel, D.R. Knighton, J. Liq. *Chromatogr.* 13 (1990) 5
- <sup>36</sup> E.C.Y. Chan, P.Y. Wee, P.Y. Ho, P.C. Ho; *J. Chromatogr. B*, 749 (2000) 179-189
- <sup>37</sup> J. Kirschbaum, B. Lucka; *J. Chromatogr. A*, 661 (1994) 193-199
- <sup>38</sup> R. A. Bank, E. J. Jansen, B. Beekman, J. M. te Koppele; *Anal. Biochem.* 240, (1996) 167-176
- <sup>39</sup> V. Lozanov, B. Benkova, L. Mateva, S. Petrov, E. Popov, C. Slavov, V. Mitev; *J. Chromatogr. B* 860 (2007) 92



- <sup>40</sup> J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado, J.A. Rosas-Rodriguez, J. Chromatogr. A 1100 (2006) 106
- <sup>41</sup> B. H. Reitsma, E. S. Yeung; Anal. Chem. 1987, 59, 1058-1061
- <sup>42</sup> R. Minocha, S. Long; J. Chromatogr. A, 1035 (2004) 63-73
- <sup>43</sup> W. Y. Lee, T. A. Nieman; J. Chromatogr. A, 659 (1994) 111-118
- <sup>44</sup> X. Kang, J. Xiao, X. Huang, Z. Gu; Clin. Chim. Acta 366 (2006) 352 – 356
- <sup>45</sup> D. P. Jonesa, J. L. Carlsons, P. S. Samieca, P. Sternberg Jr., V. C. Mody Jr., R. L. Reed, L. A. S. Brown; Clin. Chim. Acta 275 (1998) 175–184
- <sup>46</sup> G.J. Schmidt, D.C. Olson, W. Slavin; J. Chromatogr, 164 (1979) 355-362
- <sup>47</sup> V. T. Wiedmeier, S.P. Porterfield, C.E. Hendrich; J. Chromatogr., 231(1982) 410-417
- <sup>48</sup> E. Pittler, M. G. Schmid; Biomed. Chromatogr., 24 (2010) 1213-1219
- <sup>49</sup> J. Malý: *Distanční opory pro kombinované studium biologie*, Molekulární a buněčná biologie, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Přírodovědecká fakulta, Ústí nad Labem, 2006, str. 7, převzato dne 13.7.2011 z [http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni\\_a\\_bunecna\\_biologie.pdf](http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni_a_bunecna_biologie.pdf)
- <sup>50</sup> F. Štastný: *Jakou úlohu hrají D-aminokyseliny v patofyziologii schizofrenie?*, převzato 13.7.2011 z [http://www.rozhlas.cz/leonardo/clovek/\\_zprava/245501](http://www.rozhlas.cz/leonardo/clovek/_zprava/245501)
- <sup>51</sup> R. Marchelli, A. Dossena, G. Palla; Trends Food Sci. Technol. 71 (1996) 113-119
- <sup>52</sup> S. Srkalová, K. Kalčíková a E. Tesařová; Chem. Listy 102 (2008) 480-486
- <sup>53</sup> M. Gilbert: *Tea Leaves Promise Well-Being*, Natural Foods Merchandiser vol. 25, number 11, p. 46, 48; převzato 13.7.2011 z <http://newhope360.com/beverage/tea-leaves-promise-well-being>
- <sup>54</sup> K. H. Ekborg-Ott, A. Taylor, D. W. Armstrong; J. Agric. Food Chem. 45, 353-363 (1997)
- <sup>55</sup> Y. Hilal, U. Engelhardt; J. Verbr. Lebensm. 2 (2007) 414-421
- <sup>56</sup> J. H. Weisburger; Cancer Lett. 114 (1997) 315-317
- <sup>57</sup> K. G. Udall: *Green Tea: Fight Cancer, Lower Cholesterol, Live Longer*; Woodland publishing 1998, str. 6-8
- <sup>58</sup> L. A. Mitscher, V. Dolby, V. Dolby Toews: *The green tea book: China's fountain of youth*; Avery, 1998, str. 7-14
- <sup>59</sup> L. Wang, R. Xu, B. Hu, W. Li, Y. Sun, Y. Tu, X. Zeng; Food Chem. 123 (2010) 1259-1266
- <sup>60</sup> P.C. Pijl, L. Chen, T.P.J. Mulder; J. Funct. Foods 2 (2010) 239-244

- <sup>61</sup> X. Di, J. Yan, Y. Zhao, J. Zhang, Z. Shi, Y. Chang, B. Zhao; *Neuroscience* 168 (2010) 778-786
- <sup>62</sup> M. J. Desai, M. S. Gill, W. H. Hsu, D. W. Armstrong; *Chirality* 17 (2005)154-162
- <sup>63</sup> X. Zhua, B. Chena, M. Ma, X. Luo, F. Zhang, S. Yao, Z. Wan, D. Yang, H. Hangb; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 695-704
- <sup>64</sup> M. Friedman, B. E. Mackey, H. Kim, I. Lee, K. Lee, S. Lee, E. Kozukue, N. Kozukue; *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 243-253
- <sup>65</sup> F. Sari, Y. S. Velioglu; *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 1130-1135
- <sup>66</sup> R. Thippeswamy, K. G. M. Gouda, D. H. Rao, A. Martin, L. R. Gowda; *J. Agric. Food Chem* 54 (2006) 7014-7019
- <sup>67</sup> E. K. Keenan, M. D.A. Finnie, P. S. Jones, P. J. Rogers, C M. Priestley; *Food Chem.* 125 (2011) 588-594
- <sup>68</sup> Y. Lu, J. Zhang, X. Wan, M. Long, D. Li, P. Lei, Z. Zhang; *Food Chem.* 125 (2011) 277-281
- <sup>69</sup> Y. Zhao, P. Chen, L. Lin, J. M. Harnly, L. Yu, Z. Li; *Food Chemistry* 126 (2011) 1269-1277
- <sup>70</sup> P. Macháčková: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Ústav fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského, AVČR, Praha 2008