

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Gabriela Kučerová

CHIRÁLNÍ SEPARACE NOVĚ SYNTETIZOVANÝCH AMINOKYSELIN METODOU HPLC

Chiral HPLC separation of newly synthesized amino
acids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2013

podpis

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na nalezení optimálních podmínek pro chirální separace nově syntetizovaných aminokyselin pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Soubor studovaných látek obsahuje čtyři *N*-blokované deriváty D,L-Fenylalaninu, tři *N*-neblokované deriváty D,L-Fenylalaninu, D,L-Fenylalanin, jeden methylovaný derivát D,L-Tyrosinu a D,L-Tyrosin. Pro analýzu byly použity dva separační módy – reverzní mód a polárně-organický mód na dvou chromatografických kolonách – Chirobiotic[®] T a Chirobiotic[®] T2, jejichž stacionární fáze jsou tvořeny makrocyclickým antibiotikem teikoplaninem vázaným na silikagelový nosič.

V reverzním módu na koloně Chirobiotic[®] T byla použita mobilní fáze složená z methanolu a octanového pufru. Jako nejvhodnější koncentrace a pH octanového pufru se ukázala koncentrace 20 mM a pH 4,00. Ze souboru deseti studovaných enantiomerů se při výše uvedených podmínkách podařilo nalézt optimální podmínky pro osm z nich. Polárně-organický mód na koloně Chirobiotic[®] T byl vhodný pouze pro tři *N*-blokované deriváty D,L-Fenylalaninu při použití mobilní fáze složené z methanolu s malými přísadkami triethylaminu a kyseliny octové.

Kolona Chirobiotic[®] T2 při použití reverzního módu nebyla příliš vhodná pro separaci daného souboru látek. Došlo zde pouze k částečné separaci derivátu D,L-Tyrosinu, jednoho *N*-neblokovaného derivátu D,L-Fenylalaninu a k úplné separaci D,L-Tyrosinu. V polárně-organickém módu na této koloně došlo k nalezení optimálních podmínek enantioseparace všech *N*-neblokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu, D,L-Tyrosinu a k částečné separaci methylovaného derivátu D,L-Tyrosinu.

Klíčová slova: chirální separace, chirální stacionární fáze, aminokyseliny, HPLC, teikoplanin

Abstract

The aim of this work was to develop and to optimize HPLC method for enantioseparation of newly synthesized derivatives of amino acids. The set of these analytes contained four *N*-blocked derivatives of D,L-Phenylalanine, three *N*-unblocked derivatives of D,L-Phenylalanine, , one methylated derivative of D,L-Tyrosine and D,L-Tyrosine. Two separation modes *i.e.* reversed phase and polar-organic modes and two columns *i.e.* Chirobiotic[®] T and Chirobiotic[®] T2 were used. Chiral stationary phases of these columns were composed of macrocyclic antibiotic teicoplanin coated on silica gel support.

As mobile phases in reversed phase mode, methanol and acetate buffer were used with Chirobiotic[®] T column. The most suitable concentration were 20 mM and the most suitable pH value were 4.00. Under the above mentioned conditions eight analytes of ten were separated and the optimal conditions were found. Polar-organic mode and Chirobiotic[®] T column were suitable only for enantioseparation of three *N*-blocked derivatives of D,L-Phenylalanine. Mobile phases were composed of methanol with small additions of triethylamine and acetic acid.

Chirobiotic[®] T2 column in reversed phase mode was not suitable for tested set of analytes. Only partial separation of D,L-Tyrosine derivative and one *N*-unblocked D,L-Phenylalanine derivative and one baseline enantioseparation of D,L-Tyrosine were obtained. On the other hand, all *N*-unblocked D,L-Phenylalanine derivatives, D,L-Phenylalanine and D,L-Tyrosine were baseline separated in polar organic mode with Chirobiotic[®] T2 column. Partial separation of D,L-Tyrosine derivative were also obtained in polar organic mode.

Key words: chiral separation, chiral stationary phases, amino acids, HPLC, teicoplanin

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D., především za její vynikající rady, připomínky, odborné vedení a milý přístup a dále prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za poskytnuté konzultace.

Práce vznikla za finanční podpory projektů CEEPUS CIII-RO-0010-07-1213 a MŠMT ČR 0021620857.

Obsah

1 ÚVOD.....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Aminokyseliny	9
2.1.1 Nekódované aminokyseliny	9
2.2 Chiralita.....	11
2.3 Optická aktivita.....	12
2.4 D/L izomerie	13
2.5 Chirální stacionární fáze	13
2.5.1 CSP na bázi makrocyclických antibiotik.....	14
2.5.1.1 Teikoplanin	15
2.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	17
2.6.1 Reverzní mód.....	17
2.6.2 Polárně-organický mód	17
2.6.3 Chirální separace v HPLC	18
2.7 Metody pro chirální separace aminokyselin	18
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Použité přístroje a pomůcky.....	21
3.2 Použité chemikálie	21
3.3 Struktura analyzovaných látek.....	22
3.4 Příprava vzorků.....	24
3.5 Použité mobilní fáze a kolony.....	24
3.6 Podmínky separace	25
3.7 Určení mrtvého času kolony	26
3.8 Faktor asymetrie.....	26
3.9 Rozlišení	26
4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	27
4.1 Kolona Chirobiotic [®] T	27
4.1.1 Separace v reverzním módu	27
4.1.2 Separace v polárně-organickém módu	40
4.1.3 Porovnání reverzního a polárně-organického módu na koloně Chirobiotic [®] T	43
4.2 Kolona Chirobiotic [®] T2	44
4.2.1 Separace v reverzním módu	44
4.2.2 Separace v polárně-organickém módu	48
4.2.3 Porovnání reverzního a polárně-organického módu na koloně Chirobiotic [®] T2	53
4.3 Porovnání kolon Chirobiotic [®] T a Chirobiotic [®] T2	54
5 ZÁVĚR	55
6 POUŽITÁ LITERATURA	57

Seznam použitých zkratek a symbolů:

Zkratka	Název
α	Selektivita
ACN	Acetonitril
$[\alpha]_D$	Specifická optická rotace
As_1, As_2	Faktory asymetrie (1. a 2. eluujícího enantiomeru)
CD	Cyklodextrin
CE	Kapilární elektroforéze
CSP	Chirální stacionární fáze
$\varepsilon_P, \varepsilon_L$	Absorpční koeficient pravé resp. levé složky
EtOH	Ethanol
HAc	Kyselina octová
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPA	2-Propanol
k_1	Retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru
MeOH	Methanol
Me-TAG	Methylovaný teikoplanin aglykon
MF	Mobilní fáze
NP	Normální separační mód
PI	Polárně-iontový mód
PO	Polárně-organický mód
R	Rozlišení
RA	Ristocetin A
RP	Reverzní separační mód
T	Teikoplanin
TAG	Teikoplanin aglykon
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylaminoctanový pufr
t_R	Retenční čas
V	Vankomycin
VAG	Vankomycin aglykon

1 Úvod

Chirální separace metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na stacionárních fázích tvořených kovalentně navázanými makrocyclickými antibiotiky na silikagelový nosič nabývají stále většího významu. Nejen díky množství léčiv, agrochemikálií a přísad do potravin, jež jsou komerčně vyráběny jako racemické směsi, ale také díky vývoji syntetických α -aminokyselin a malých peptidů, dále díky komercializaci chirálních stacionárních fází (CSP) a celkově díky potřebě dokázat oddělit dané enantiomery kvůli jejich rozdílným fyziologickým a farmakologickým účinkům [1, 2, 3].

Výhodou separačního systému s CSP na bázi makrocyclických antibiotik je jednoznačně jeho aplikovatelnost na široký okruh látek a jeho multimodálnost – tedy možnosti separace v normálním (NP), reverzním (RP), polárně-organickém (PO), polárně-iontovém módu a v hydrofilní interakční chromatografii (HILIC) [3, 4].

Cílem práce bylo tedy nalézt optimální podmínky pro chirální separace nově syntetizovaných aminokyselin – derivátů fenylalaninu a tyrosinu. Analýza byla prováděna pomocí HPLC ve dvou separačních módech – RP a PO módu. Byla porovnávána retence a enantioseparace aminokyselin na dvou teikoplaninových kolonách – Chirobiotic[®] T a Chirobiotic[®] T2.

2 Teoretická část

2.1 Aminokyseliny

Kódované aminokyseliny jakožto složky živých systémů patří do konfigurační řady L, řadíme sem 20 aminokyselin. Rozdíl mezi D-formou a L-formou v achirálním prostředí spočívá zejména ve stabilitě, přičemž L-forma je stabilnější. Kódované aminokyseliny dělíme na esenciální, neesenciální a podmíněně esenciální [5, 6, 7].

D-aminokyseliny je možné nalézt v buněčné stěně bakterií. Spolu s některými L-aminokyselinami tvoří krátké peptidové řetězce, které zesilují *N*-acetylglukosamin a *N*-acetylmuramovou kyselinu. Tyto monomery jsou základem pro peptidoglykan, jež je typickým polymerem vyskytujícím se právě v buněčné stěně gram-negativních i gram-pozitivních bakterií [8].

Některé D-aminokyseliny hrají významnou roli v buněčné signalizaci u savců, zahrnujíce i člověka [9].

Aminokyseliny jako takové jsou jedny z nejlépe prozkoumaných chirálních sloučenin [5, 10].

2.1.1 Nekódované aminokyseliny

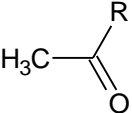
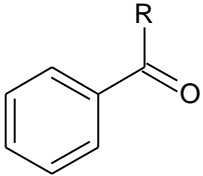
Nekódované aminokyseliny hrají v dnešní době významnou roli. Jsou důležitým nástrojem při výzkumu a vývoji nových léčiv. Jejich strukturální a funkční rozmanitost dává možnosti jejich využití jako chirálních stavebních bloků a molekulárního lešení při konstrukci kombinatorických knihoven [11].

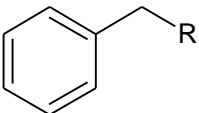
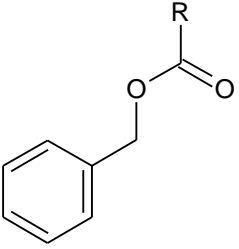
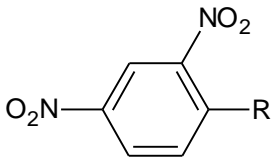
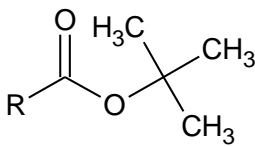
Zejména syntetické α -aminokyseliny se uplatňují ve výzkumu peptidů. β -aminokyseliny můžeme označit jako prekurzory β -laktamů, složky alkaloidů a peptidů, klíčové komponenty v inhibičních pochodech a v neposlední řadě stavební bloky důležité v peptidomimetice [12]. Některé nekódované aminokyseliny jsou využívány jako léčiva, příkladem může být L-Dopa, užívající se ke zmírnění projevů Parkinsonovy choroby či cykloserin jako antibiotikum účinné proti bakterií *Mycobacterium tuberculosis* [13, 14]. Využití D-řady aminokyselin nalézáme např.

v potravinářském průmyslu, především u hodnocení kvality potravin (poměr enantiomerů složek potravin ovlivňuje jejich chuť, vůni ale i výživovou hodnotu) [5]. Výskyt D-formy aminokyselin v živých organizmech je vzácný, nikoliv vyloučitelný, důvodem mohou být neobvyklé přeměny. Toxicita D-aminokyselin není zatím nijak prokázána, stejně tak ani jejich metabolická dráha. Zdroj těchto látek nacházíme především v potravě či díky degradaci buněčné stěny mikroorganismů [5]. Dextrotyroxin (enantiomer tyreoidálního hormonu levotyroxinu) se užívá jako hypolipidemický prostředek. Halogenované aminokyseliny jsou zajímavé z hlediska jejich jedinečného metabolismu a fyziologické aktivity, proto jsou užívány jako složky různých antibiotických přípravků [13, 15].

Zejména důležité pro již zmíněný výzkum peptidů jsou *N*-blokované aminokyseliny (i *C*-blokované aminokyseliny), slouží jako prekurzory při syntéze peptidů a díky *N*-blokaci (resp. *C*-blokaci) jsou rezistentní vůči racemizaci [16]. Po provedení potřebných syntetických kroků jsou blokující skupiny uvolněny. NH_2 -skupina aminokyselin je chráněna různými chemickými strukturami. Pro představu je malý výčet těchto skupin uveden v Tabulce 1. Dostupná literatura uvádí, že nejužívanější z *N*-chránících skupin je *tert*-butyloxykarbonyl [1, 17].

Tab. 1. *N*-blokující skupiny* [1]

Chemická struktura	Název	Zkratka
	Acetyl-	Ac
	Benzoyl-	Bz

Chemická struktura	Název	Zkratka
	Benzyl-	<i>Bn</i>
	Benzyloxykarbonyl-	<i>Z</i>
	2,4-dinitrofenyl-	<i>DNP</i>
	<i>t</i> -Butyloxykarbonyl-	<i>BOC</i>

* tyto skupiny jsou vázány přes R-zbytek na NH₂-skupinu aminokyselin

2.2 Chiralita

Látky běžně se vyskytující v přírodě jsou chirální a chiralita je jejich přirozenou vlastností. Význam slova „chirální“ je odvozen od řeckého slova *chiros* – ruka. Za chirální objekty považujeme ty, jež nejsou ztotožnitelné se svým zrcadlovým obrazem. Chiralitu vyvolává přítomnost určitých strukturních částí v dané molekule, tzv. prvků chiralit [18, 19, 20].

- Tyto prvky dělíme do třech kategorií:
1. Chirální centrum (centrální chiralita)
 2. Chirální osa (axiální chiralita)
 3. Chirální rovina (planární chiralita)

Chirální sloučeniny nemají rovinu ani střed symetrie.

V případě existence jednoho z výše uvedených prvků chiralit můžeme danou

molekulu označit jako celkově chirální. Výskyt dvou a více prvků chiralit může vyvolat vyrušení (tzv. mezoformu) a molekula chiralitu nevykazuje [19, 20].

Chirální izomery (tzv. enantiomery) se v chirálním prostředí (resp. při interakci s chirálním objektem) ve svých vlastnostech liší, zatímco v achirálním prostředí se jeví jako totožné [18, 20].

Centrální chiralita je dána přítomností chirálního atomu (např. uhlíku, síry, fosforu) v molekule, z něhož vystupují čtyři různé substituenty (různé z hlediska své konstituce či konfigurace). Čím více center chiralit molekula obsahuje, tím více má i stereoizomerů. Platí závislost 2^n , kdy n je počet chirálních center. Axiální chiralitu vyvolává přítomnost čtyř substituentů, které neleží v jedné rovině. Na spojnicích dvojic substituentů pak leží osa chiralit. Planární chiralita je vyvolána přítomností dvojice různých substituentů, které leží ve společné rovině a dále přítomností minimálně jednoho substituentu, který leží mimo tuto rovinu, ale je s danou rovinou spojený chemickou vazbou [20].

2.3 Optická aktivita

Optická aktivita je schopnost stáčení roviny lineárně polarizovaného světla o určitý experimentální úhel α . Jedním z parametrů, kterým lze identifikovat chirální sloučeniny a především jejich čistotu, je tabelovaná hodnota tzv. specifická optická rotace $[\alpha]_D$. Všechny chirální látky by měly být opticky aktivní. Racemická směs, tj. směs enantiomerů v poměru 1:1 není opticky aktivní [20, 21].

Chiroptické metody umožňují zkoumání chirálních látek (zjišťování absolutních konfigurací, identifikaci a analýzu). Mezi tyto metody patří metoda zvaná cirkulární dichroizmus resp. CD spektroskopie [22, 23].

Cirkulární dichroizmus je fyzikální jev, na jehož principu je možné měřit hodnoty absorpčních koeficientů pravé a levé cirkulárně polarizované složky ϵ_P a ϵ_L přístrojem zvaným dichrograf či dichrometr. Při měření dochází k zaznamenávání rozdílů absorbancí cirkulárně polarizovaných paprsků, které jsou střídavě propouštěny vzorkem. Ve výsledných křivkách je zaznamenán pozitivní či negativní Cottonův efekt v závislosti na přítomnosti pásu s pozitivním či

negativním maximem [21, 24, 25].

2.4 D/L izomerie

Za určující látku pro D/L izomerii u aminokyselin byl zvolen alanin. Jako určující chirální uhlík označujeme α -uhlík, na kterém je navázaná NH_2 -skupina.

Jde-li NH_2 -skupina od COOH -skupiny doleva, jedná se o L-formu, jde-li doprava, jedná se o D-formu [26, 27].

Méně se vyskytují tzv. β -, γ - a δ -aminokyseliny, které mají NH_2 -skupinu navázanou na β -, γ - či δ -uhlíku [28].

β -aminokyseliny mohou být součástí některých peptidů, cyklopeptidů a nebo se vyskytují inkorporovány do sekundárních metabolitů některých cyanobakterií, hub či rostlin [29].

Alicyklické β -aminokyseliny nacházejí uplatnění v medicíně zejména díky jejich protiplísňové aktivitě a jsou dále zkoumány jako nástroj při neurologických poruchách [30].

2.5 Chirální stacionární fáze

CSP můžeme rozdělit do několika skupin dle typu jednotlivých chirálních selektorů a to: proteinové, Pirklovy, polysacharidové, cyklodextrinové, ligand-výměnné, cyklofruktanové, korunové ethery a CSP na bázi makrocyclických antibiotik o nichž bude pojednáno v následující kapitole [31, 32].

Jako proteinové CSP se užívají přírodní proteiny (např. hovězí sérový albumin, lidský sérový albumin, α -kyselý glykoprotein), které jsou navázány na silikagelovém nosiči. Pirklovy CSP jsou malé molekuly vázané na silikagelový nosič. Dělíme je do třech skupin: π -elektron donorové, π -elektron akceptorové a π -elektron donorové/ π -elektron akceptorové [33]. Jako polysacharidové CSP označujeme ty, jež obsahují opticky aktivní biopolymery či přírodní polysacharidy (např. celulóza, amylóza). Cyklodextrinové (CD) CSP jsou tvořeny cyklickými oligosacharidy (α -, β -, γ -CD, obsahující 6, 7 a 8 glukopyranosových jednotek) [31]. Ligand-výměnné CSP obsahují vázaný iont kovu v ligandu a enantioseparace

probíhá díky tvorbě koordinačních komplexů mezi centrálním atomem přechodného kovu, chirálním selektorem a separovaným enantiomerem. Používají se např. tyto inoty: Cu(II), Zn(II) či Ni(II) [33, 34]. Příprava a použití cyklofruktanových CSP bylo poprvé publikováno v roce 2009 prof. D. W. Armstrongem. Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy složené z β -2,1 spojených šesti, sedmi či osmi D-fruktofuranozových jednotek [35]. Jako korunové ethery označujeme makrocyclické polyethery vázané na silikagelovém nosiči. Korunové ethery obsahují kavitu o specifické velikosti a jsou užívány k separaci enantiomerů, které obsahují primární NH₂-funkční skupinu [31, 36].

2.5.1 CSP na bázi makrocyclických antibiotik

CSP na bázi makrocyclických antibiotik jsou široce uplatnitelné nejen v HPLC, ale např. i v mikro-HPLC, kapilární elektroforéze (CE) a kapilární elektrochromatografii. Široká selektivita těchto CSP může být připsána schopnosti poskytovat různé typy interakcí. CSP na bázi makrocyclických antibiotik můžeme dále dělit do těchto skupin: ansamyciny, polypeptidy, aminoglykosidy a glykopeptidy [37, 38, 39].

Do skupiny ansamycinů řadíme rifamycin B a rifamycin SV. Tyto chirální selektory byly dříve výhradně užívány k separacím metodou CE. V dnešní době jejich užití jako CSP pro HPLC aplikace kleslo. Mezi polypeptidové CSP řadíme thiostrepton, který produkuje bakterie *Streptomyces azureus*. K CSP na bázi aminoglykosidů patří: kanamycin, streptomycin, fradiomycin B a fradiomycin C. Tyto CSP se v dnešní době již v HPLC moc nepoužívají, ale byly publikovány práce s použitím těchto selektorů v CE [1, 39].

Jako glykopeptidové CSP označujeme avoparcin, ristocetin, vankomycin a teikoplanin. Tyto CSP jsou nejvíce užívanými chirálními selektory vůbec a byly objeveny a popsány v roce 1994 prof. D. W. Armstrongem. Jejich unikátní složité struktury obsahují velké množství chirálních center a funkčních skupin, které umožňují interakci s enantiomery skrze π - π interakci, H-vazbu, elektrostatickou a hydrofobní interakci a sterické bránění [1, 4, 40].

Avoparcin existuje ve dvou hlavních formách – α a β , které se liší vazbou vodíku, resp. chlóru na rhamnosidovém aglykonu. Je to fermentační produkt bakterie *Streptomyces candidus* a není komerčně dostupný [1]. Ristocetin je fermentační produkt bakterie *Nocardia lurida* a je účinný proti gram-pozitivním bakteriím. Jako chirální selektor je užíván ve svých dvou formách A a B, které se liší v počtu glukozových, manozových, rhamnozových a D-arabinozových skupin v postranních řetězcích. Vankomycin je amfoterní glykopeptid produkovaný bakteriemi *Streptomyces orientalis* nebo *Amycolatopsis orientalis* a vyskytuje se jako směs strukturně podobných sloučenin [1, 32].

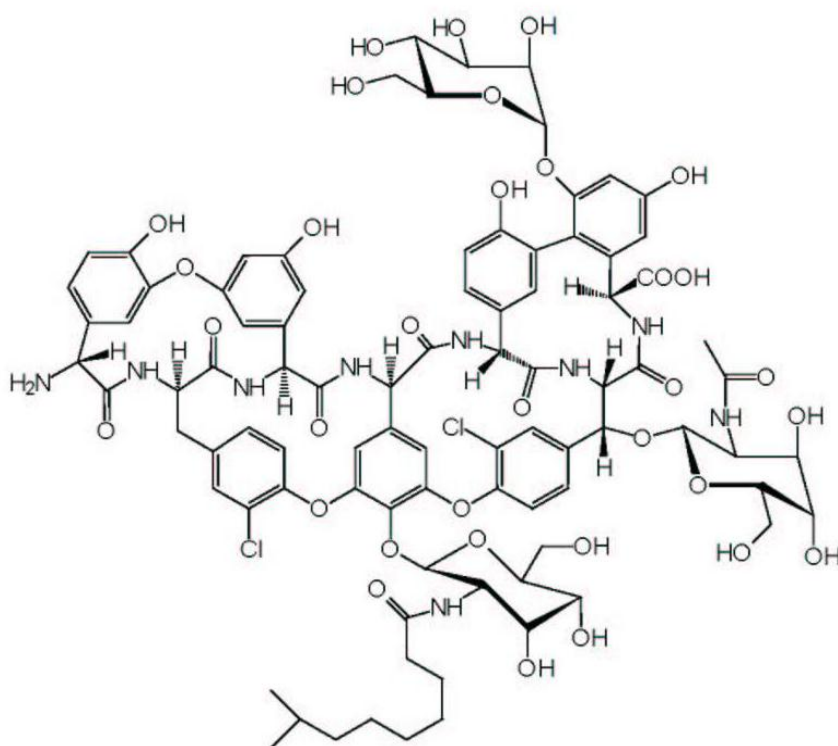
2.5.1.1 Teikoplanin

Teikoplanin produkuje aktinomyceta *Actinoplanes teichomyceticus* a jako antibiotikum je účinné proti aerobním i anaerobním gram-pozitivním bakteriím. Glykopeptidová antibiotika, mezi která teikoplanin řadíme, jsou schopna se vázat na koncovou sekvenci D-Ala-D-Ala, kterou je možné nalézt v peptidu, jež funguje jako substrát transpeptidázové reakce při zesíťování polysacharidových řetězců v buněčné stěně bakterií. Tímto mechanismem se tedy přeruší syntéza buněčné stěny bakterie a buňka lyzuje [41, 42].

Teikoplanin obsahuje 23 stereogenních center, 4 makrocykly, 7 aromatických kruhů, 3 cukerné zbytky a 1 hydrofobní řetězec. Na Obrázku 1 je znázorněna struktura teikoplaninu [1, 39, 43].

Kromě teikoplaninové CSP se v dnešní době užívá T2 CSP. Rozdílem je vyšší pokrytí silikagelu chirálním selektorem u T2 CSP s cílem zisku vyšší stereoselektivní interakce s analyty. U komerčně dodávaných kolon dále nacházíme rozdílné vlastnosti silikagelu, na který je teikoplanin navázaný. Pro T CSP se užívá silikagel o porozitě 120 Å, kdežto pro T2 CSP 200 Å. V neposlední řadě také spojka mezi silikagelem a teikoplaninem je v případě T2 CSP dvakrát delší. Další modifikace teikoplaninu jsou TAG CSP (rozdíl spočívá v chybějících sacharidových zbytcích na molekule TAGu) a Me-TAG CSP (methylovou skupinou derivatizované volné hydroxylové skupiny po chybějících sacharidových zbytcích) [43, 44, 45, 46].

Teikoplaninové CSP lze využít pro separace širokého okruhu látek (chirální molekuly zahrnující organické báze, neutrální látky, aminokyseliny atd.). Příkladem může být analýza tryptofanu, fenylalaninu, leucinu a kyseliny mandlové a jejich derivátů v RP módu za použití mobilní fáze (MF) obsahující methanol (MeOH) a 1% triethylaminoctanový pufr (TEAA) (60/40) (v/v) [43], či enantioseparace β -blokátorů (např. propranolol, atenolol, salbutamol) při použití PO módu s různým složením mobilní fáze obsahující MeOH, triethylamin (TEA) a kyselinu octovou (HAc) či pouze MeOH a TEA [47]. Dále pak enantioseparace tyroxinu a trijodtyroninu v RP módu za použití mobilní fáze složené z MeOH a H₂O (70/30) (v/v) [37] nebo enantioseparace ketoprofenu v RP módu při použití mobilní fáze MeOH/1% TEAA (pH 6,8) (90/10) (v/v) [48]. V neposlední řadě analýza indolových fytoalexinů v NP módu při užití mobilní fáze *n*-hexan a ethanol (EtOH) (80/20) (v/v) či *n*-hexan a 2-propanol (IPA) (95/5) (v/v) [40].



Obr. 1. Struktura teikoplaninu [39]

2.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

HPLC je separační metoda, která poskytuje jak kvalitativní tak kvantitativní informaci o analyzovaných látkách. Separace probíhá v separační koloně, která obsahuje stacionární fázi a protéká jí mobilní fáze. Dochází zde k interakci analyzovaných látek se sorbentem a k distribuci mezi mobilní a stacionární fázi – čímž jsou analyty rozdílně zadržovány a tím zpožděovány [49].

V následujících kapitolách jsou velmi stručně zmíněny módy, v nichž bylo měření provedeno. Obecně jsou doplněny převažující interakce dle literatury, avšak je nutné brát zřetel na povahu použité CSP, mobilní fáze a taktéž na povahu analyzovaných látek.

2.6.1 Reverzní mód

V reverzním módu HPLC je mobilní fáze polárnější než stacionární fáze. Mobilní fáze je tvořena organickým rozpouštědlem (nejčastěji methanol či acetonitril), a vodou či vodným pufrem [50, 51].

Technika reverzní chromatografie je využívána pro separace téměř všech typů sloučenin, nejen těch chorálních [52].

Převažujícími interakcemi u chirálních separací v tomto módu jsou iontové interakce, hydrofobní interakce, H-vazba a sterické repulze. Všechny tyto interakce mohou přispívat k chirálnímu rozlišení [31].

2.6.2 Polárně-organický mód

Mobilní fáze u PO módu je tvořena ACN a MeOH s malým přídavkem HAc a TEA. Poměr ACN a MeOH má zejména vliv na retenci, zatímco množství a poměr HAc a TEA na selektivitu. Mobilní fáze u nového PO módu je tvořena MeOH s malým přídavkem HAc a TEA [32, 53].

U PO módu pro chirální aplikace převažují tyto typy interakcí: H-vazba, dipólové interakce, π - π interakce a sterické interakce [31].

2.6.3 Chirální separace v HPLC

HPLC je velmi využívaná metoda pro chirální separace širokého okruhu látek. Existují dvě možnosti použití: přímá a nepřímá metoda [10, 13].

Přímou separací označujeme děj, kdy jsou analyty separovány přímo pomocí různých CSP (vhodný chirální selektor navázaný na nosiči). Dochází k velkému počtu typů interakcí a alespoň jedna musí být stereoselektivní. Výhodou přímé chirální separace pomocí CSP je jednoznačně nepotřebná chirální předúprava analytu a relativně časová nenáročnost. Za nevýhodu můžeme označit cenovou náročnost komerčně dostupných kolon [13, 31, 36, 45].

Dále za přímou separaci označujeme přidavek vhodného chirálního selektoru do mobilní fáze, kde již začínají vznikat diastereoizomerní komplexy a ty pak mohou být separovány na vhodné nechirální stacionární fázi. Popřípadě lze z důvodu vyšší separační účinnosti použít i CSP, avšak s jiným vázaným chirálním selektorem, než byl přidán do mobilní fáze [31, 45].

Při užití nepřímé separace je třeba analyzované látky nejprve derivatizovat chirálním činidlem. Vzniklé diastereoizomerní páry lze poté separovat na vhodné achirální stacionární fázi. Nevýhodou je časová náročnost a velmi vysoké nároky zejména na čistotu derivatizačního činidla. Jednou z výhod je právě separace na achirální stacionární fázi [13, 31, 36, 45].

2.7 Metody pro chirální separace aminokyselin

V Tabulkách 2 a 3 jsou shrnuty chromatografické podmínky, které se využívají pro chirální separace různých aminokyselin na CSP na bázi makrocyclických antibiotik, konkrétně glykopeptidů.

Tab. 2. Podmínky enantioseparace aminokyselin na CSP na bázi makrocyklických antibiotik

Separované enantiomery	CSP	Mobilní fáze	Cit.
34 neproteinogenních aminokyselin	T	MeOH/H ₂ O (70/30), (60/40), (40/60), (20/80) (v/v)	[51]
Alanin, Fenylalanin, <i>t</i> -Leucin, cyklohexylalanin, aminocykloalkan-karboxylové kyseliny	T	MeOH/ H ₂ O, EtOH/ H ₂ O, IPA/ H ₂ O, ACN/ H ₂ O (60/40) (v/v)	[54]
21 nekódovaných α -aminokyselin (deriváty Fenylalaninu a Tyrosinu), 10 β -aminokyselin	T	MeOH/H ₂ O (v/v) – různé objemové poměry	[55]
Derivatizované analogy Fenylalaninu	T	MeOH/H ₂ O (v/v) – různé objemové poměry	[56]
Derivatizované analogy Glycinu, Alaninu a Fenylalaninu	T	MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1), MeOH/1% TEAA (pH 4,1), MeOH/1% TEAA (pH 6,5) (v/v) – různé objemové poměry	[57]
15 nekódovaných α -aminokyselin (deriváty Fenylalaninu a Tyrosinu), 12 β -aminokyselin	T, TAG	MeOH/H ₂ O (v/v), MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1) (v/v), MeOH/HAc/TEA (v/v/v) – různé objemové poměry	[50]
Alanin, Fenylalanin a deriváty, Tryptofan a deriváty	T, TAG	MeOH/70mM TEAA (pH 4,1) (40/60) (v/v), ACN/MeOH/HAc/TEA (55/45/0,3/0,2) (v/v/v/v)	[53]
Derivatizované analogy Fenylalaninu	RA	MeOH/ H ₂ O (50/50) (v/v), ACN/H ₂ O (50/50), (v/v), MeOH/0,1% TEAA (pH 7,0) (20/80) (v/v), MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1) (20/80) (v/v), ACN/0,1% TEAA (pH 4,1) (10/90) (v/v)	[58]
Derivatizované analogy Glycinu, Alaninu a Fenylalaninu	RA	MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1), MeOH/1% TEAA (pH 4,1), MeOH/1% TEAA (pH 6,5) (v/v) – různé objemové poměry	[57]
28 nekódovaných derivátů Fenylalaninu a Tyrosinu	RA	MeOH/H ₂ O (v/v), MeOH/HAc/TEA (v/v/v) – různé objemové poměry	[1]
β^2 , β^3 -homoaminokyseliny	T,T2, TAG	MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1) (70/30) (v/v)	[46]
β -aminokyseliny, β -laktamy	T, TAG, RA	100% MeOH, MeOH/0,1% TEAA (pH 6,5) (90/10), (70/30), (45/55) (v/v), MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1) (40/60) (v/v)	[59]

Tab. 3. Podmínky enantioseparace *N*-blokových aminokyselin na CSP na bázi makrocyclických antibiotik

Separované enantiomery	CSP	Mobilní fáze	Cit.
<i>N</i> -Ac-aminokyseliny (Glycin, Alanin, Leucin, Fenylalanin), <i>N</i> - <i>t</i> -BOC-Valin, Prolin, Tyrosin	T [*]	MeOH/pufr ^a (40/60) (<i>v/v</i>), MeOH/20 a 50 mM octan amonný (60/40) (<i>v/v</i>), ACN/10 a 30 mM octan amonný (40/60), (60/40) (<i>v/v</i>)	[60]
<i>N</i> - <i>t</i> -BOC-Tyrosin, Fenylalanin, Tryptofan a Arginin	T	MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1), MeOH/1% TEAA (pH 4,1), ACN/0,1% TEAA (pH 4,1), ACN/1% TEAA (pH 4,1) (<i>v/v</i>) – různé objemové poměry	[17]
<i>N</i> - <i>t</i> -BOC-Tyrosin, Fenylalanin, Tryptofan, Alanin a Leucin	T	MeOH/1% TEAA (pH 4,1), ACN/1% TEAA (pH 4,1) (<i>v/v</i>) – různé objemové poměry	[16]
<i>N</i> -Ac-Alanin, Leucin, Methionin, Fenylalanin	T	MeOH/1% TEAA (pH 4,1) (25/75) (<i>v/v</i>)	[61]
<i>N</i> -Ac-2-F-Fenylalanin, <i>N</i> -Ac-3-F-Fenylalanin, <i>N</i> -Ac-4-F-Fenylalanin, <i>N</i> -Ac-Alanin, <i>N</i> -Bz-Alanin, Arginin, Methionin, Valin, <i>N</i> - <i>t</i> -BOC-Fenylalanin, Tyrosin, <i>N</i> -DNP-Methionin	RA	MeOH/ H ₂ O (50/50) (<i>v/v</i>), ACN/ H ₂ O (50/50) (<i>v/v</i>), MeOH/0,1% TEAA (pH 7,0) (20/80) (<i>v/v</i>), MeOH/0,1% TEAA (pH 4,1) (20/80) (<i>v/v</i>), ACN/0,1% TEAA (pH 4,1) (10/90) (<i>v/v</i>)	[58]
<i>N</i> -Z-aminokyseliny, homo-Fenylalanin	T	ACN/MeOH/HAc/TEA (<i>v/v/v/v</i>) – různé objemové složení	[1]
<i>N</i> - <i>t</i> -BOC-aminokyseliny, <i>N</i> -Z-aminokyseliny	A	ACN/MeOH/HAc/TEA (950/50/1,0/0,5) (<i>v/v/v/v</i>)	[1]

^{*}T CSP nebyla komerčně dodána, nýbrž připravena v laboratoři

^a10,20,30,50 mM octan amonný

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Vysokoúčinný kapalinový chromatograf

HPLC Waters, 2690 D, Waters, Milford, MA, USA

Detektor Waters 2487, Waters, Milford, MA, USA

Software Empower, Waters, Milford, MA, USA

Kolony

Astec Chirobiotic[®] T, rozměry 25cm x 4,6mm, velikost částic 5μm, SUPELCO[®], North Harrison Road, Bellefonte, USA

Astec Chirobiotic[®] T2, rozměry 25cm x 4,6mm, velikost částic 5μm, SUPELCO[®], North Harrison Road, Bellefonte, USA

Další pomůcky

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC 30, ELMA, Německo

Váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko

pH metr PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

Počítačový program Origin, verze 6.1

Počítačový program ACD/ChemSketch, verze 11

3.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda, úprava pomocí zařízení Ultrapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, výrobce Watrex[®], Praha, Česká republika

Methanol Chromasolv[®] for high-performance liquid chromatography, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

Triethylamin, min 99%, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

Kyselina octová, ≥ 99%, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

Octan amonný, BioUltra, ≥ 99%, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

α -Methyl-D,L-Tyrosin, D,L-4-F-Fenylalanin, Z-D,L-4-F-Fenylalanin, Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester, D,L-4-Cl-Fenylalanin, Z-D,L-3-F-Fenylalanin, D-2-F-Fenylalanin, L-2-F-Fenylalanin, Z-D,L-2-F-Fenylalanin, látky byly připraveny

v laboratoři prof. Tamary Pajpanové, Sofie, Bulharsko

D,L-Tyrosin, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

D,L-Fenylalanin, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

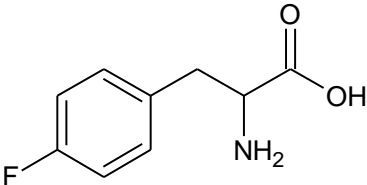
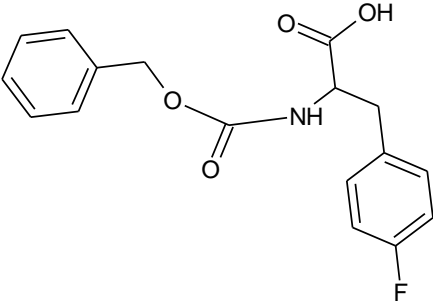
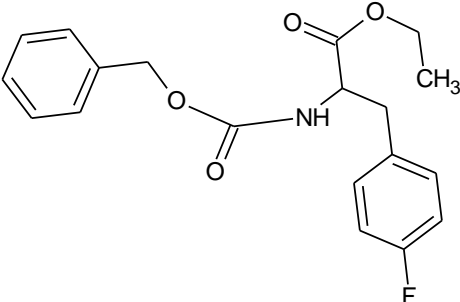
Jodid draselný, Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Německo

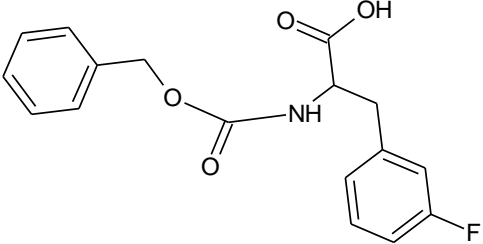
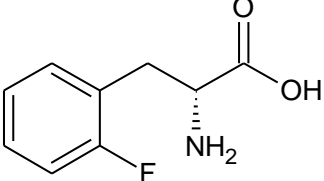
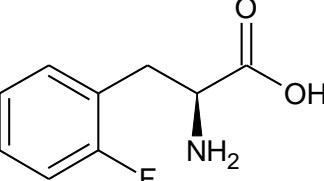
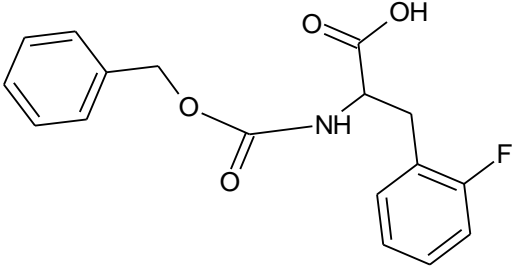
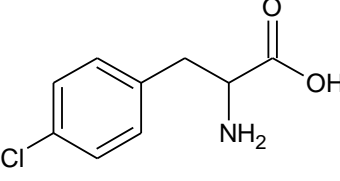
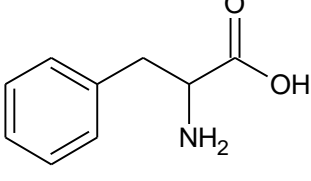
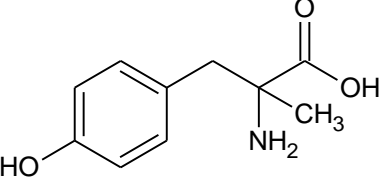
3.3 Struktura analyzovaných látek

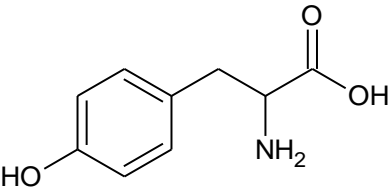
Název a strukturu analyzovaných látek shrnuje Tabulka 4.

Z-předpona u některých níže uvedených názvů naznačuje přítomnost *N* - benzyloxykarbonyl skupiny.

Tab. 4. Analyzované látky

Název látky	Struktura
1. D,L-4-F-Fenylalanin	
2. Z-D,L-4-F-Fenylalanin	
3. Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester	

Název látky	Struktura
4. Z-D,L-3-F-Fenylalanin	
5. D-2-F-Fenylalanin	
6. L-2-F-Fenylalanin	
7. Z-D,L-2-F-Fenylalanin	
8. D,L-4-Cl-Fenylalanin	
9. D,L-Fenylalanin	
10. α -Methyl-D,L-Tyrosin	

Název látky	Struktura
11. D,L-Tyrosin	

3.4 Příprava vzorků

Vzorky daných látek byly připraveny dle Tabulky 5. Navážka jednotlivých standardů činila 1 mg.

Tab. 5: Příprava vzorků

Název látky	Příprava
1. D,L-4-F-Fenylalanin	1000 μ l MeOH + 100 μ l H ₂ O, ultrazvuk
2. Z-D,L-4-F-Fenylalanin	1000 μ l MeOH, ultrazvuk
3. Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester	1000 μ l MeOH, ultrazvuk
4. Z-D,L-3-F-Fenylalanin	1000 μ l MeOH, ultrazvuk
5. D-2-F-Fenylalanin ^a	1000 μ l MeOH + 100 μ l H ₂ O, ultrazvuk
6. L-2-F-Fenylalanin ^a	1000 μ l MeOH + 100 μ l H ₂ O, ultrazvuk
7. Z-D,L-2-F-Fenylalanin	1000 μ l MeOH, ultrazvuk
8. D,L-4-Cl-Fenylalanin	1000 μ l MeOH + 100 μ l H ₂ O, ultrazvuk
9. D,L-Fenylalanin	1000 μ l MeOH, ultrazvuk
10. α -Methyl-D,L-Tyrosin	800 μ l H ₂ O + 200 μ l MeOH, ultrazvuk, filtrace ^b
11. D,L-Tyrosin	800 μ l H ₂ O + 200 μ l MeOH, ultrazvuk, filtrace ^b

^a pro analýzu byly tyto vzorky smíchány v jednotkovém poměru

^b 0,45 μ m PTFE filtr

3.5 Použité mobilní fáze a kolony

Použité mobilní fáze a kolony shrnují Tabulky 6 a 7.

Pro přípravu 1l pufru bylo použito navážené množství octanu amonného dle požadované výsledné koncentrace. Toto množství bylo následně rozpuštěno

v deionizované vodě a přidáváním kyseliny octové bylo dosaženo požadovaného pH. Následně byl pufr doplněn deionizovanou vodou do objemu 1l.

Tab. 6. Kolony a mobilní fáze použité v RP módu

Kolona	Mobilní fáze
Chirobiotic [®] T	MeOH/H ₂ O (70/30) (v/v)
Chirobiotic [®] T	MeOH/H ₂ O (60/40) (v/v)
Chirobiotic [®] T	MeOH/H ₂ O (40/60) (v/v)
Chirobiotic [®] T	MeOH/H ₂ O (20/80) (v/v)
Chirobiotic [®] T	MeOH/20mM octanový pufr, pH 4,00 (80/20) – (20/80) (v/v)*
Chirobiotic [®] T	MeOH/20mM octanový pufr, pH 5,00 (80/20) – (30/70) (v/v)*
Chirobiotic [®] T	MeOH/20mM octanový pufr, pH 3,00 (80/20) – (30/70) (v/v)*
Chirobiotic [®] T	MeOH/25mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30) (v/v)*
Chirobiotic [®] T	MeOH/15mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30) (v/v)*
Chirobiotic [®] T2	MeOH/20mM octanový pufr, pH 4,00 (70/30) – (20/80) (v/v)*

* změna složení mobilní fáze probíhala po 10-ti objemových procentech mimo poměr 50 MeOH/50 pufr (v/v)

Tab. 7. Kolony a mobilní fáze použité v PO módu

Kolony	MF MeOH/TEA/HAc (v/v/v)
	100/0,5/0,5
	100/0,5/0,1
	100/0,1/0,5
Chirobiotic [®] T a T2	100/0,3/0,3
	100/0,3/0,1
	100/0,1/0,3
	100/0,05/0,05

3.6 Podmínky separace

Separace derivátů D,L-Fenylalaninu a D,L-Tyrosinu byla prováděna v RP a PO módu na obou kolonách. Dávkovaný objem byl 10 µl. Pro detekci byla použita vlnová délka 254 nm. Průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Kolona i analyzované látky byly termostatovány na 25°C. V závislosti na složení použité mobilní fáze se

měnil tlak vyvíjený na kolonu. Eluce probíhala izokraticky.

3.7 Určení mrtvého času kolony

Mrtvý čas kolony byl zjištěn nadávkováním jodidu draselného. Na koloně Chirobiotic® T byl určen mrtvý čas 2,322 minut. Pro kolonu Chirobiotic® T2 platí mrtvý čas 2,537 minut.

3.8 Faktor asymetrie

Faktor asymetrie 1. a 2. eluujícího enantiomeru (A_{S1}) a (A_{S2}) byl vypočten dle vzorce, který uvádí Rovnice 1.

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

Rovnice 1. Vzorec výpočtu faktoru asymetrie 1. a 2. eluujícího enantiomeru (A_{S1}) a (A_{S2}); $w_{0,05}$ je šířka píku v 5% výšky, f je poměr šířky píku vzestupné k sestupné části píku v 5% výšky píku

3.9 Rozlišení

Rozlišení dvou sousedních píků (R) bylo vypočteno dle vzorce, který uvádí Rovnice 2.

$$R = \frac{1,18 (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

Rovnice 2. Vzorec výpočtu rozlišení (R), t_{R1} a t_{R2} jsou retenční časy 1. a 2. eluujícího enantiomeru, w_1 a w_2 jsou šířky píku v 50% výšky píku 1. a 2. eluujícího enantiomeru

4 Výsledky a diskuze

4.1 Kolona Chirobiotic® T

4.1.1 Separace v reverzním módu

Jako první byly použity mobilní fáze obsahující methanol a deionizovanou vodu v různých objemových poměrech. Bylo postupováno od složení mobilní fáze MeOH/H₂O (70/30) (v/v) do (20/80) (v/v). Tabulka 8 zachycuje retenční časy studovaných látek v závislosti na složení mobilní fáze. Uvedeny jsou retenční časy prvního eluovaného enantiomeru, tj. L-enantiomeru, v případě, že docházelo alespoň k částečné separaci. Separační pořadí jednotlivých enantiomerů bylo zjištěno nadávkováním L-izomeru za stejných podmínek, jako při měření racemické směsi.

Tab. 8. Retenční časy (t_R) analyzovaných látek v závislosti na složení mobilní fáze

Název analytu	t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)	t_R (min)
	MF A	MF B	MF C	MF D
D,L-4-F-Fenylalanin	5,041	4,982	5,171	5,601
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	2,017 ^a	2,112 ^a	2,367 ^a	3,583 ^a
Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester	3,567 ^a	4,249 ^a	9,917 ^a	9,355 ^a
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	2,033 ^a	2,113 ^a	2,650 ^a	3,467 ^a
D,L-2-F-Fenylalanin	5,061	4,985	5,144	5,468
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	2,040 ^a	2,127 ^a	2,633 ^a	3,567 ^a
D,L-4-Cl-Fenylalanin	5,489	5,522	6,168	7,043
D,L-Fenylalanin	5,319	5,156	5,272	5,542
α -Methyl-D,L-Tyrosin	4,643*	4,513*	4,593*	4,969*
D,L-Tyrosin	4,801	4,602	4,621	4,779

A= 70/30 MeOH/H₂O (v/v), B= 60/40 MeOH/H₂O (v/v)

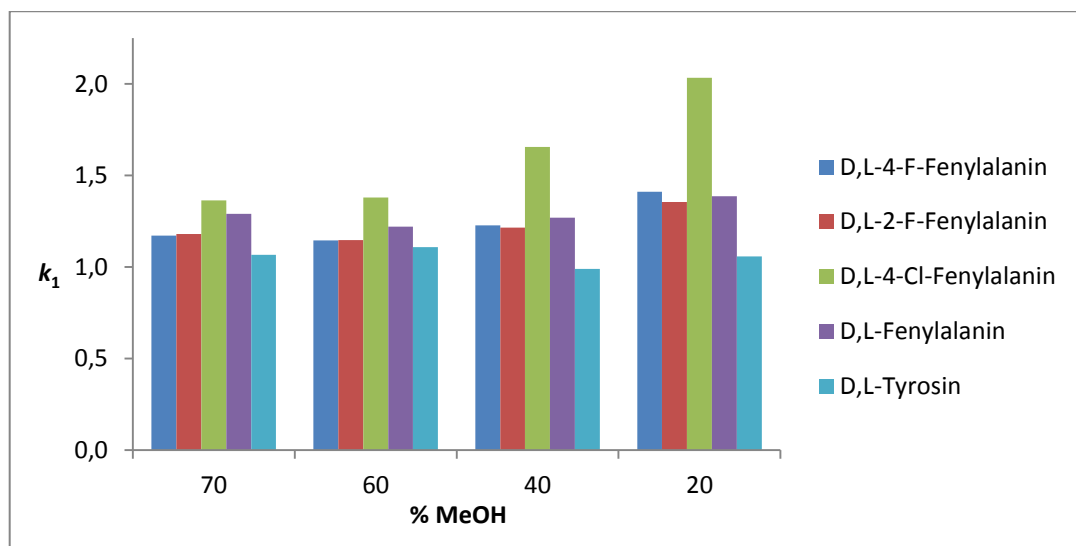
C= 40/60 MeOH/ H₂O (v/v), D= 20/80 MeOH/ H₂O (v/v)

* u takto označených látek nedocházelo ani k náznaku separace

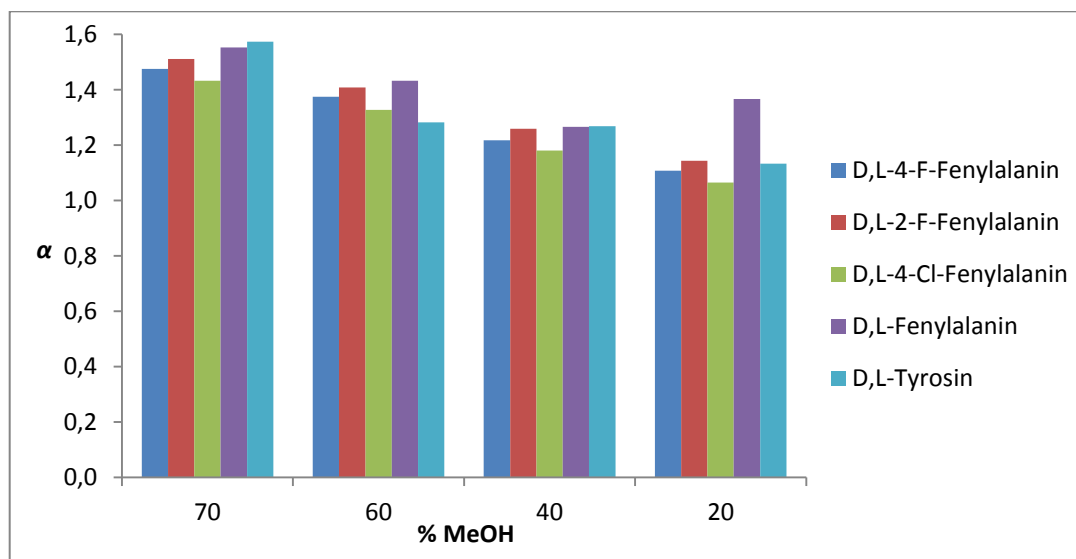
Z Tabulky 8 je patrné, že látky, které obsahují *N-Z* skupinu eluovaly s mrtvým

časem kolony. U těchto látek tedy nedocházelo k separaci. U ostatních derivatizovaných aminokyselin kromě α -Methyl-D,L-Tyrosinu docházelo alespoň k částečné separaci enantiomerů

Na Obrázku 2 a 3 jsou zachyceny retenční faktory 1. eluujícího enantiomeru a selektivita separujících se látek v závislosti na obsahu methanolu v mobilní fázi.



Obr. 2. Závislost retenčního faktoru 1. eluujícího enantiomeru (k_1) na obsahu MeOH v MF



Obr. 3. Závislost selektivity (α) na obsahu MeOH v MF (v)

Obrázek 2 vykazuje zvyšující se retenční faktor se snižujícím se množstvím methanolu v mobilní fázi u analyzovaných látek kromě D,L-Fenylalaninu a D,L-Tyrosinu, lze tedy říci, že jsou látky na koloně více zadržovány a jejich retenční časy se prodlužují. Z Obrázku 3 je patrné, že se snižujícím se objemovým zlomkem methanolu v mobilní fázi se snižuje i selektivita daných látek s nepatrnou výjimkou opět u látek D,L-Fenylalanin a D,L-Tyrosin.

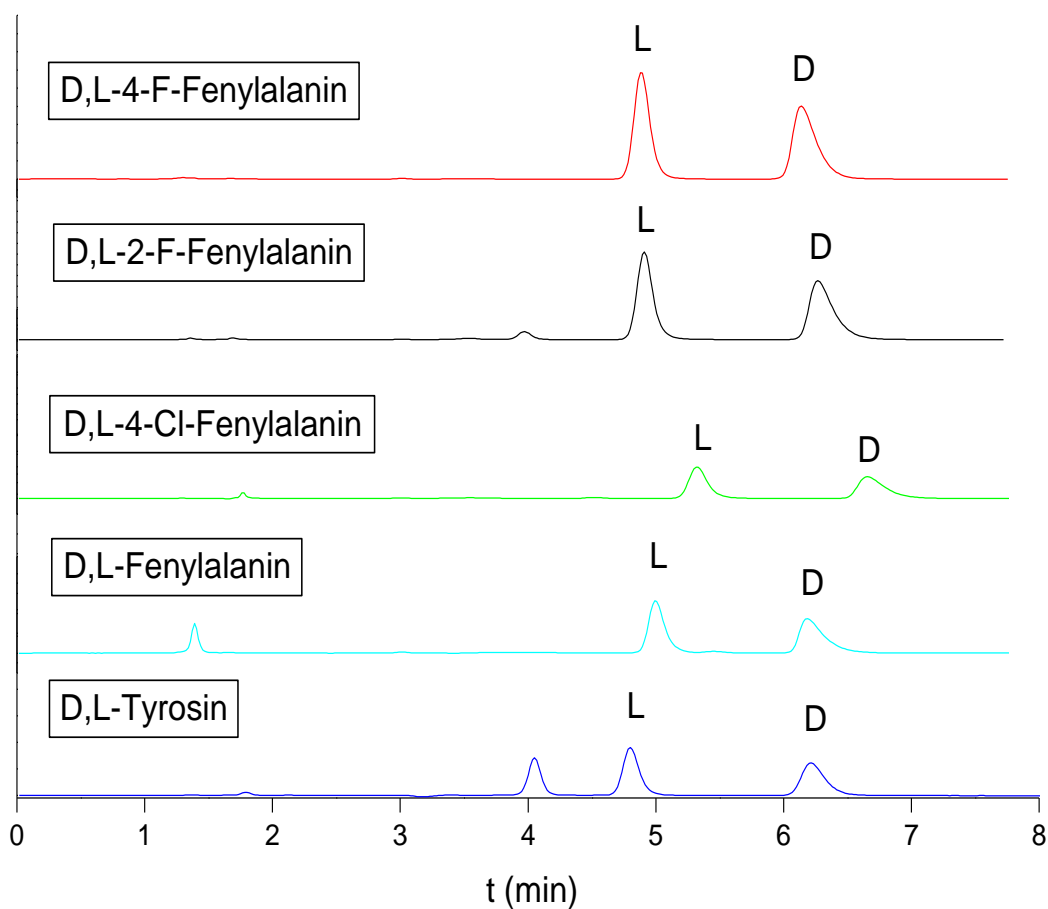
Faktor asymetrie (As_1) dříve eluovaných enantiomerů, tedy L-enantiomerů se pohyboval u látek uvedených v Tabulce 9 v rozmezí hodnot 1,1 – 1,3. Tyto hodnoty asymetrie jsou velmi příznivé a tzv. chvostování píků je velmi nepatrné. Později eluované enantiomery, tedy D-enantiomery vykazovaly hodnoty pro faktor asymetrie (As_2) v rozmezí 1,4 – 1,9. Hodnoty asymetrie pro D-enantiomery značí viditelné chvostování, čehož si lze i povšimnout z níže uvedeného Obrázku 4.

Tabulka 9 shrnuje chromatografické parametry za optimálních podmínek – pro látku D,L-Fenylalanin byla vyhodnocena jako nejvhodnější mobilní fáze MeOH/H₂O (60/40) (v/v) a pro ostatní látky uvedené v Tabulce 9 je nejvhodnější mobilní fáze MeOH/H₂O (70/30) (v/v).

Tab. 9. Retenční faktor 1. elujícího enantiomeru (k_1) a rozlišení (R) separovaných látek za optimálních podmínek

Název analytu	k_1	R
D,L-4-F-Fenylalanin	1,171	4,439
D,L-2-F-Fenylalanin	1,180	4,803
D,L-4-Cl-Fenylalanin	1,364	4,139
D,L-Fenylalanin	1,221	4,189
D,L-Tyrosin	1,067	4,994

Hodnoty rozlišení vyšší než 1,5 značí separaci téměř na základní linii. Obrázek 4 zachycuje chromatogramy enantioseparací těchto látek za optimálních podmínek.



Obr. 4. Chromatogram separace D,L-Fenylalaninu, jeho derivátů a D,L-Tyrosinu, kolona Chirobiotic[®] T, D,L-Fenylalanin MF MeOH/H₂O (60/40) (v/v), ostatní látky MF MeOH/ H₂O (70/30) (v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Dále bylo přistoupeno k použití mobilní fáze, která obsahovala pufr místo vodné složky. Jako první byl použit 20mM octanový pufr o pH 4,00.

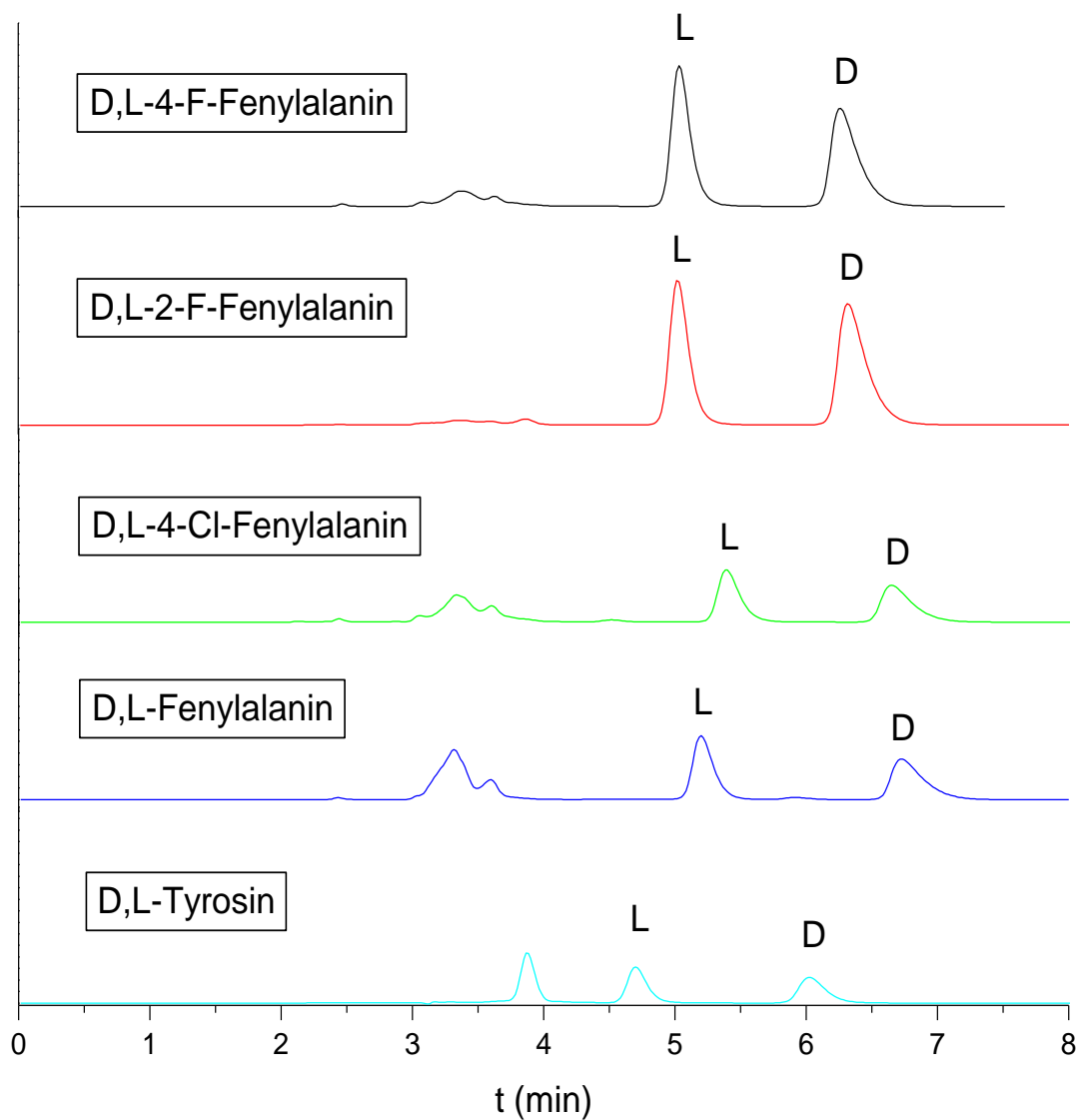
V tomto separačním systému došlo k úplné separaci všech látek kromě Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylesteru a α -Methyl-D,L-Tyrosinu. Pro každý separovaný analyt je v Tabulce 10 uvedena optimální mobilní fáze, při které došlo k separaci na základní linii a separační charakteristiky daných látek.

Tab. 10. Retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru (k_1), rozlišení (R), faktory asymetrie 1. a 2. eluujícího enantiomeru (As_1) a (As_2) a optimální MF separovaných analytů

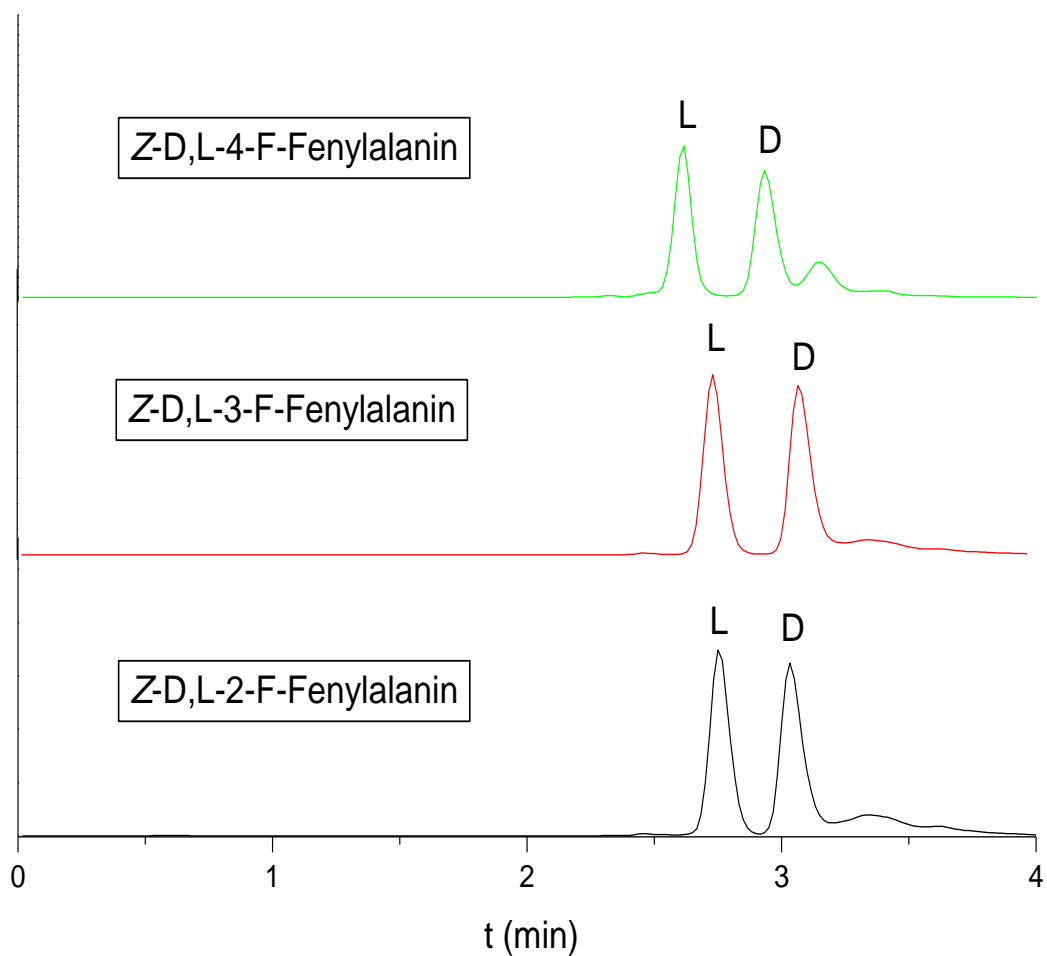
Název analytu	k_1	R	As_1	As_2	MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00
D,L-4-F-Fenylalanin	1,169	3,907	1,337	1,640	70/30 (v/v)
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	0,125	2,372	1,060	1,089	80/20 (v/v)
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	0,177	2,305	1,092	1,194	70/30 (v/v)
D,L-2-F-Fenylalanin	1,164	3,994	1,310	1,642	70/30 (v/v)
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	0,186	1,879	1,135	1,173	70/30 (v/v)
D,L-4-Cl-Fenylalanin	1,323	3,457	1,410	1,681	70/30 (v/v)
D,L-Fenylalanin	1,239	4,243	1,368	1,852	70/30 (v/v)
D,L-Tyrosin	1,025	4,147	1,298	1,390	70/30 (v/v)

Hodnoty asymetrií zvláště pro *N*-blokované látky jsou velmi příznivé, čehož si lze i dále všimnout v Obrázcích 5 a 6, které zachycují chromatogramy separací za použití optimálních podmínek pro analyty uvedené v Tabulce 10.

Z Obrázku 5 a 6 je patrné, že analyzované látky vykazovaly krátké retenční časy zároveň s příznivými hodnotami rozlišení. V porovnání s použitím mobilní fáze složené z methanolu a vody se u látek zlepšila asymetrie, zvláště u *D*-enantiomerů. Dle Obrázku 6, v případě *N*-blokovaných analytů došlo k separaci na základní linii ve velmi krátkých retencích, což u mobilní fáze složené z methanolu a vody pozorováno nebylo (docházelo k eluci s mrtvým časem kolony). Použití 20 mM octanového pufru o pH 4,00 tedy významně přispělo k enantioseparaci *N*-blokovaných derivátů fenylalaninu.

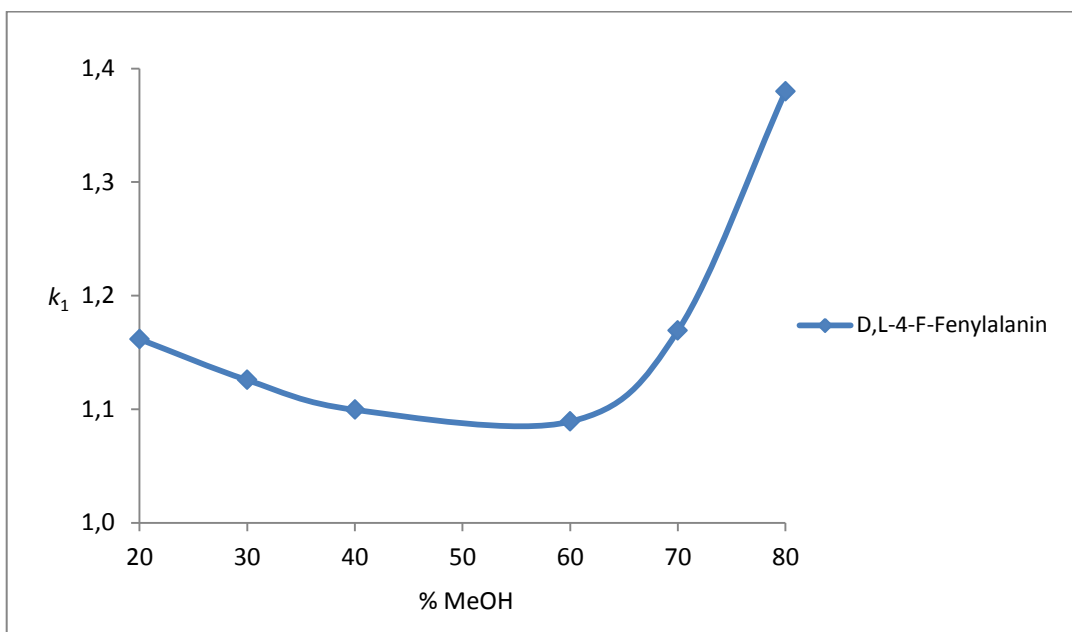


Obr. 5. Chromatogram separace D,L-Fenylalaninu, jeho derivátů a D,L-Tyrosinu, kolona Chirobiotic[®] T, MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm



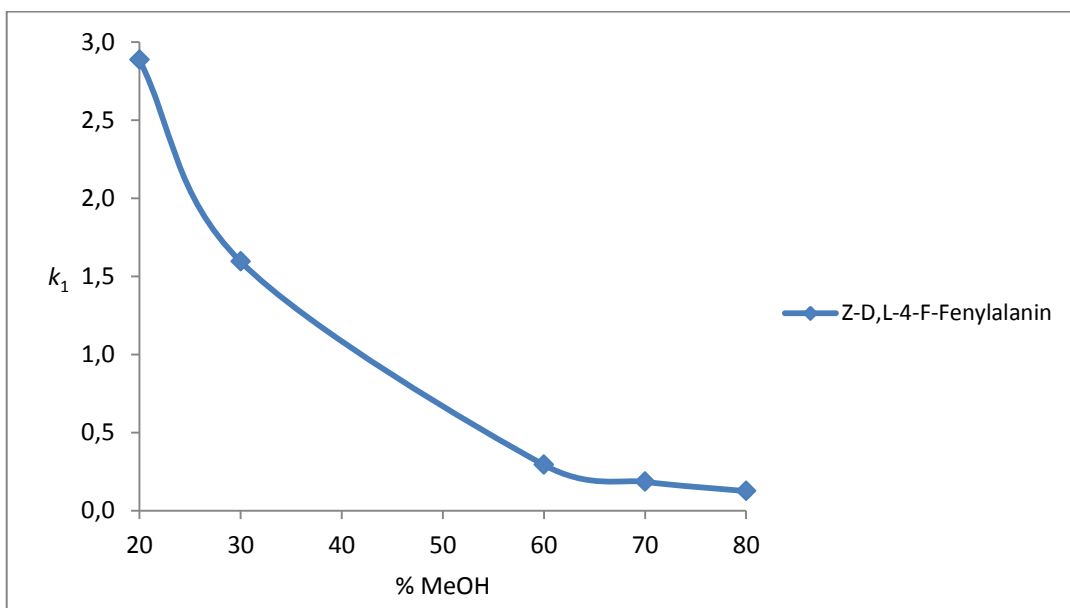
Obr. 6. Chromatogram separace *N*-blokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu, kolona Chirobiotic[®] T, Z-D,L-4-F-Fenylalanin MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (80/20) (*v/v*), Z-D,L-3-F-Fenylalanin a Z-D,L-2-F-Fenylalanin MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (*v/v*), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Obrázek 7 a 8 zachycuje závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru na množství methanolu v mobilní fázi pro D,L-4-F-Fenylalanin a Z-D,L-4-F-Fenylalanin.



Obr. 7. Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru (k_1) na množství MeOH v MF pro D,L-4-F-Fenylalanin

Z Obrázku 7 a 8 je patrné, že *N*-neblokovaný analyt vykazuje „U-tvar“ křivky, kdežto *N*-blokovaný, více nepolární analyt, tento „U-tvar“ nevykazuje. Pro látku Z-D,L-4-F-Fenylalanin platí, že se snižujícím se objemovým zlomkem methanolu v mobilní fázi se ztelně prodlužuje retence oproti látce D,L-4-F-Fenylalanin, u které k jistému, ale ne příliš rapidnímu prodloužení retence došlo. Z těchto výsledků je patrné, že teikoplaninová stacionární fáze může být použita jako reverzní i HILIC CSP.



Obr. 8. Závislost retenčního faktoru 1. eluujícího enantiomeru (k_1) na množství MeOH v MF pro Z-D,L-4-F-Fenylalanin

Dále byl zkoumán vliv pH pufru na kvalitu enantioseparace. Byly použity mobilní fáze obsahující methanol a 20 mM octanový pufr o pH 3,00 a pH 5,00 v různých objemových poměrech.

Při použití hodnot pH pufru 3,00 a 5,00 nedošlo k náznaku separace u látky Z-D,L-4-F-Fenylalanin–ethylester a ani u α -Methyl-D,L-Tyrosinu, stejně jako při použití 20 mM octanového pufru o pH 4,00.

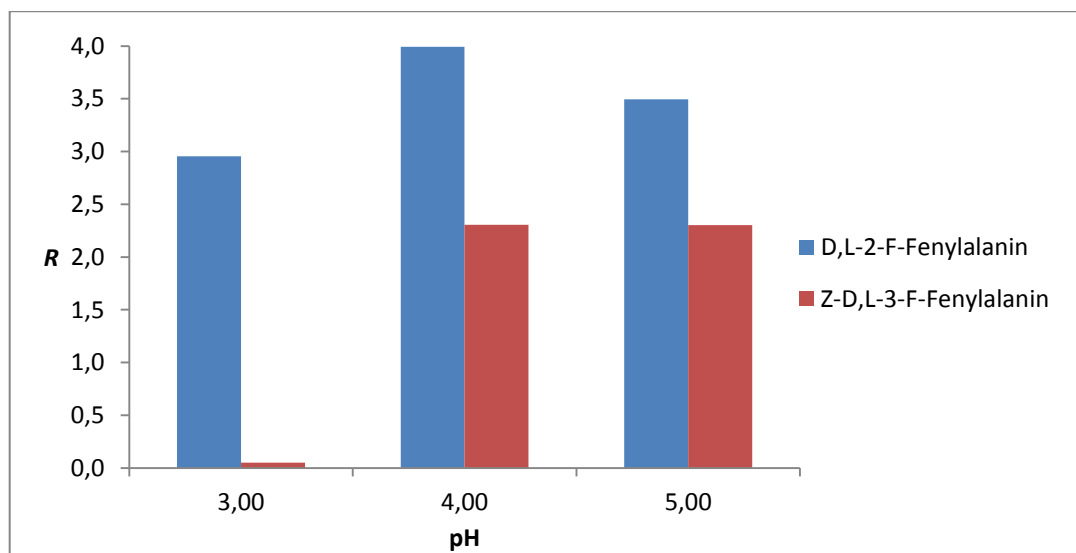
Tabulka 11 porovnává hodnoty rozlišení v závislosti na hodnotě pH při užití mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr (70/30) (v/v) pro analyty uvedené v Tabulce 11. Analyty Z-D,L-4-F-Fenylalanin–ethylester a α -Methyl-D,L-Tyrosin nejsou v Tabulce 11 uvedeny, neboť nedocházelo k separaci za uvedených podmínek.

Tab. 11. Rozlišení (*R*) analytů při různých hodnotách pH 20 mM octanového pufru

Název analytu	pH 3,00	pH 4,00	pH 5,00
	<i>R</i>		
D,L-4-F-Fenylalanin	2,723	3,907	3,000
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	-	2,372	1,961
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	-	2,305	2,303
D,L-2-F-Fenylalanin	2,954	3,994	3,494
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	-	1,879	2,044
D,L-4-Cl-Fenylalanin	2,697	3,457	-
D,L-Fenylalanin	3,265	4,243	3,208
D,L-Tyrosin	2,804	4,147	2,921

- u takto označených látek nedocházelo k separaci, proto zde není uvedena hodnota rozlišení

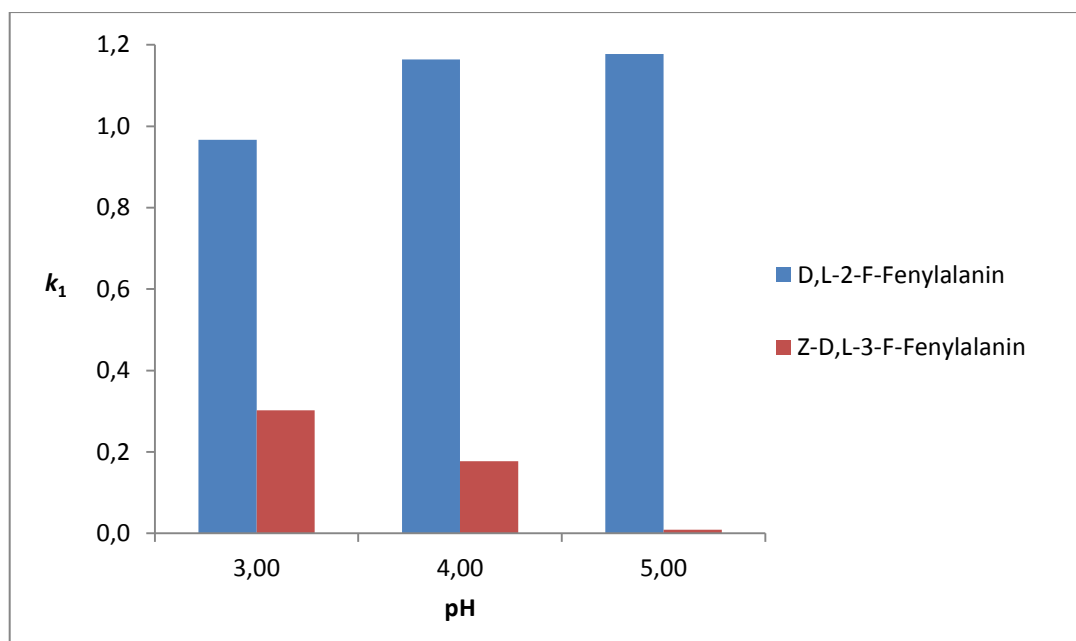
Obrázek 9 zobrazuje závislost rozlišení na hodnotě pH pufru pro látky D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-3-F-Fenylalanin při použití mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr (různé hodnoty pH pufru) (70/30) (*v/v*).



Obr. 9. Závislost rozlišení (*R*) na pH pufru pro D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-3-F-Fenylalanin, MF MeOH/20 mM octanový pufr (70/30) (*v/v*)

Z Obrázku 9 je patrné, že pH pufru 4,00 je jak pro *N*-blokované, tak pro *N*-neblokované analyty nejvhodnější, neboť poskytuje nejvyšší hodnotu rozlišení. Při použití 20 mM octanového pufru o hodnotách pH 3,00 a 5,00 u *N*-neblokovaných analytů sice k separaci na základní linii došlo, ale na úkor asymetrie píků.

Obrázek 10 dále srovnává retenční faktor prvního eluovaného enantiomeru, tedy L-enantiomeru separovaných analytů v závislosti na hodnotě pH pufru při použití MF MeOH/20 mM octanový pufr (70/30) (v/v).

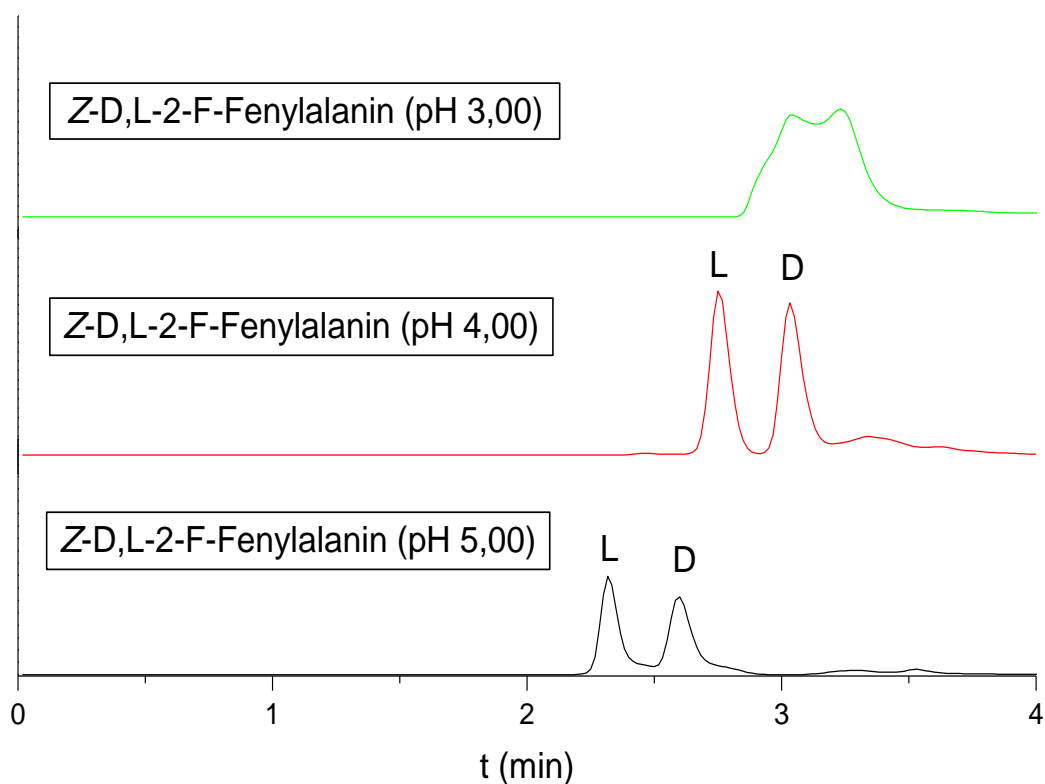


Obr. 10. Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru (k_1) na pH pufru pro D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-3-F-Fenylalanin, MF MeOH/20 mM octanový pufr (70/30) (v/v)

Z Obrázku 10 lze diskutovat následující: pro látku D,L-2-F-Fenylalanin při použití 20 mM octanového pufru o hodnotě pH 3,00 retence L-enantiomeru nepatrně klesla u hodnoty pH pufru 5,00 byla retence srovnatelná s retencí pro hodnotu pH pufru 4,00, u látky Z-D,L-3-F-Fenylalanin se retence L-enantiomeru při pH pufru 3,00 nepatrně prodloužila a u hodnoty pH pufru 5,00 L-enantiomer téměř eluoval s mrtvým časem kolony.

Pro ukázkou jsou na Obrázku 11 zachyceny chromatogramy Z-D,L-2-F-

Fenylalaninu při použití mobilní fáze složené z methanolu a 20 mM octanového pufru a hodnotě pH 3,00, 4,00 a 5,00.



Obr. 11. Chromatogram separace Z-D,L-2-F-Fenylalaninu, kolona Chirobiotic[®] T, MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 3,00, 4,00 a 5,00 (70/30) (v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Z Obrázku 11 lze vidět, že pro hodnotu pH pufru 3,00 a ani pro hodnotu pH pufru 5,00 nedošlo k separaci na základní linii, odezvy studované látky jsou nižší a asymetrie u hodnoty pH 5,00 oproti pH 4,00 je horší.

Jako optimální hodnota pH pufru byla na základě dosažených výsledků zvolena hodnota 4,00.

Následně byl zkoumán vliv koncentrace pufru o hodnotě pH 4,00 na kvalitu enantioseparace. Byl použit octanový pufr o koncentracích 15 mM, 20 mM a 25 mM.

Při použití 15 mM octanového pufru o pH 4,00 nedošlo k separaci Z-D,L-4-F-Fenylalaninu, Z-D,L-3-F-Fenylalaninu a Z-D,L-2-F-Fenylalaninu, ovšem při použití 20 mM octanového pufru o pH 4,00 k separaci došlo. V případě těchto látek tedy snížení koncentrace pufru přínosné nebylo.

U 25 mM octanového pufru nedošlo k separaci u látek Z-D,L-3-F-Fenylalaninu, D,L-2-F-Fenylalaninu a Z-D,L-2-F-Fenylalaninu oproti 20 mM octanovému pufru o pH 4,00.

Tabulka 12 porovnává hodnoty rozlišení v závislosti na koncentraci octanového pufru o pH 4,00 v mobilní fázi MeOH/octanový pufr pH 4,00 70/30 (v/v). Analyty Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester a α -Methyl-D,L-Tyrosin nejsou v Tabulce 12 uvedeny, neboť nedocházelo k separaci za uvedených podmínek.

Tab. 12. Rozlišení (*R*) analyzovaných látek při různých hodnotách koncentrace octanového pufru o pH 4,00

Název analytu	15 mM	20 mM	25 mM
	<i>R</i>		
D,L-4-F-Fenylalanin	1,635	3,907	1,696
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	-	2,372	1,085
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	-	2,305	-
D,L-2-F-Fenylalanin	1,998	3,994	-
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	-	1,879	-
D,L-4-Cl-Fenylalanin	1,667	3,457	1,634
D,L-Fenylalanin	2,264	4,243	2,094
D,L-Tyrosin	3,117	4,147	2,965

- u takto označených látek nedocházelo k separaci, proto zde není uvedena hodnota rozlišení

Z Tabulky 12 vyplývá, že hodnoty rozlišení jsou podstatně nižší při použití octanového pufru o pH 4,00 a koncentraci 15 mM či 25 mM v porovnání s koncentrací 20 mM. Ačkoliv v některých případech k separaci na základní linii

došlo, zhoršily se faktory asymetrie (As_1) a (As_2) studovaných látek, jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí 2,2-2,7.

Tabulka 13 srovnává retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru, selektivitu, rozlišení a faktor asymetrie 1. a 2. eluujícího enantiomeru pro látku D,L-4-F-Fenylalanin při použití mobilní fáze MeOH/octanový pufr pH 4,00 o hodnotách koncentrace 15 mM, 20 mM a 25 mM (70/30) (v/v).

Tab. 13. Retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru (k_1), selektivita (α), rozlišení (R) a faktor asymetrie 1. a 2. eluujícího enantiomeru (As_1) a (As_2) pro D,L-4-F-Fenylalanin při různých hodnotách koncentrace octanového pufru o pH 4,00

	15 mM	20 mM	25 mM
k_1	1,059	1,169	1,054
α	1,473	1,452	1,492
R	1,635	3,907	1,696
As_1	2,232	1,337	2,088
As_2	2,678	1,640	2,358

Z Tabulky 13 jasně vyplývá, že nejvhodnější koncentrace octanového pufru o pH 4,00 pro soubor studovaných látek je koncentrace 20 mM.

4.1.2 Separace v polárně-organickém módu

Dále byl použit PO mód pro chirální separace studovaných aminokyselin. Tento mód byl úspěšně použit pro separace různých aminokyselin podle literatury (36).

Byly použity mobilní fáze obsahující MeOH, TEA a HAc v objemových poměrech, jež udává Tabulka 7 (str. 25).

V PO módu na koloně Chirobiotic[®] T docházelo k separaci pouze *N*-blokových látek s výjimkou *Z*-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylesteru, možným důvodem je přítomnost ethylu na kyslíku karboxylové skupiny. *N*-neblokované analyty nevykazovaly známky separace v žádné z použitých mobilních fází.

Tabulka 14 shrnuje chromatografické parametry pro látky, u nichž k separaci na základní linii došlo.

Tab. 14. Retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru (k_1), selektivita (α), rozlišení (R) a optimální MF separovaných látek

Název analytu	k_1	α	R	MF MeOH/TEA/HAc (v/v/v)
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	0,430	1,700	2,461	100/0,5/0,1
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	0,431	1,622	2,210	100/0,3/0,1
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	0,416	1,412	1,521	100/0,5/0,1

Hodnoty rozlišení jsou pro Z-D,L-4-F-Fenylalanin a Z-D,L-3-F-Fenylalanin dostatečné, avšak pro Z-D,L-2-F-Fenylalanin hodnota rozlišení je vyšší než 1,5, ale velmi nepatrně.

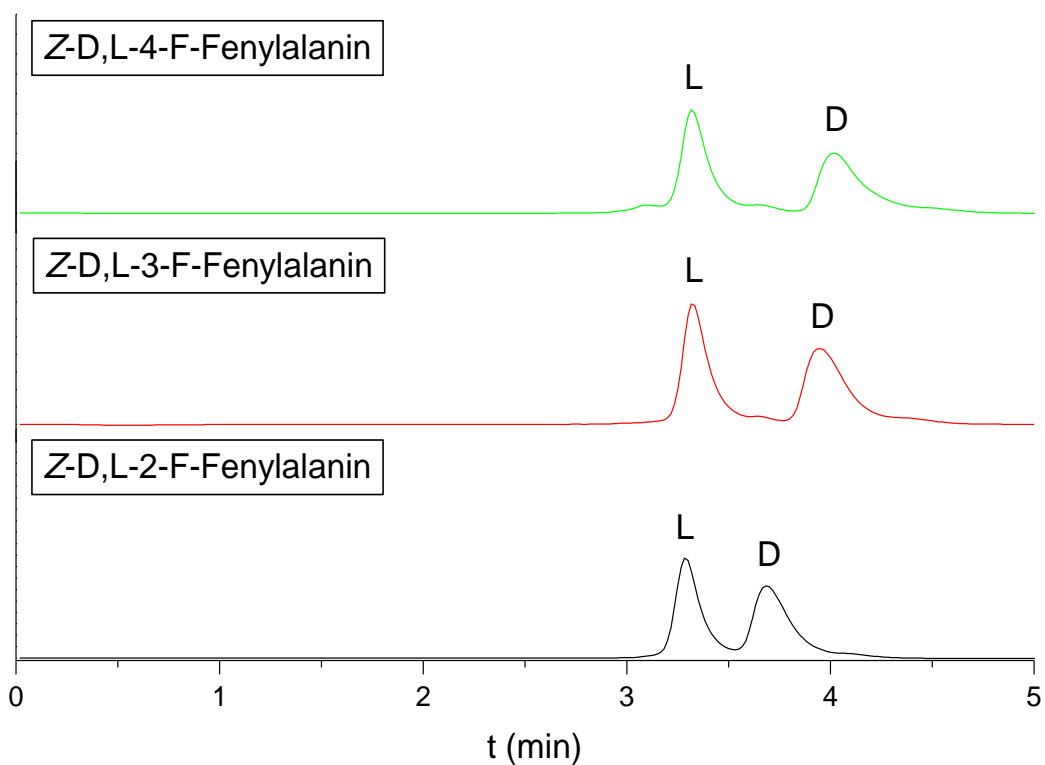
Opět si lze všimnout dobré asymetrie látek z Tabulky 15. Dříve eluovaný L-enantiomer vykazuje opět lepší asymetrii, než později eluovaný D-enantiomer.

Tab. 15. Faktory asymetrie 1 a 2. eluujícího enantiomeru (As_1) a (As_2) separovaných látek

Název analytu	As_1	As_2
Z-D,L-4-F-Fenylalanin	1,365	1,632
Z-D,L-3-F-Fenylalanin	1,378	1,516
Z-D,L-2-F-Fenylalanin	1,334	-

- hodnota As_2 nebyla dostupná z důvodu neúplné separace na základní linii

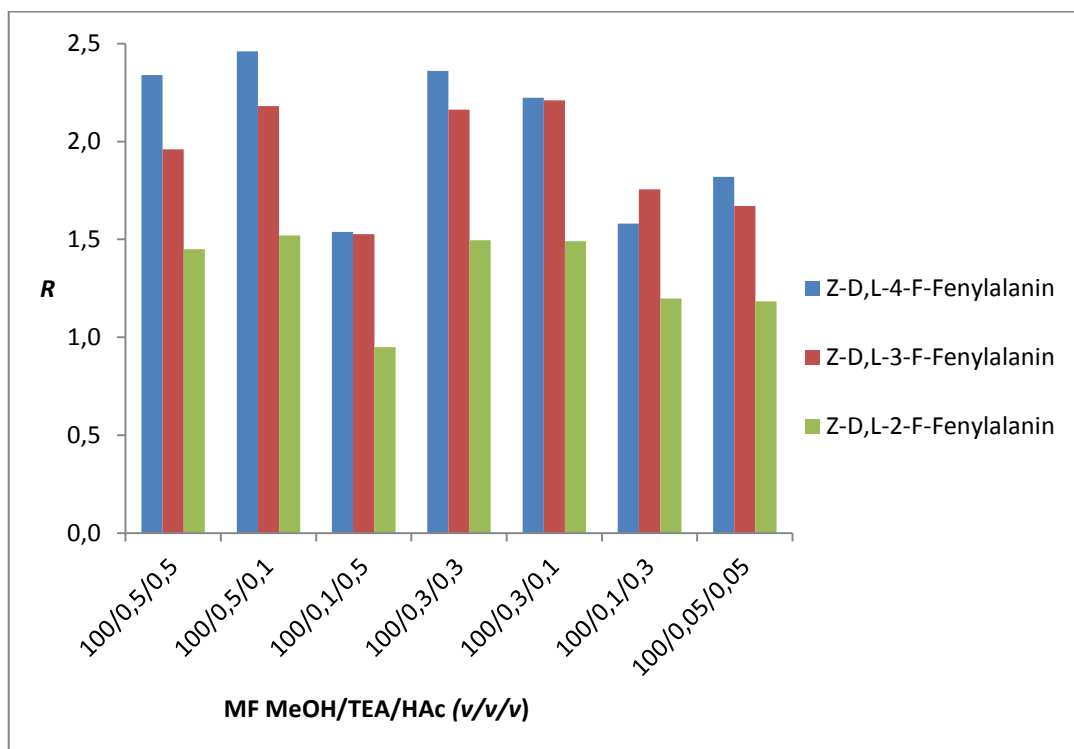
Obrázek 12 zachycuje separaci *N*-blokovaných látek uvedených v Tabulce 14 za optimálních separačních podmínek.



Obr. 12. Chromatogram separace *N*-blokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu, kolona Chirobiotic[®] T, Z-D,L-4-F-Fenylalanin a Z-D,L-2-F-Fenylalanin MF MeOH/TEA/HAc (100/0,5/0,1) (v/v/v), Z-D,L-3-F-Fenylalanin MF MeOH/TEA/HAc (100/0,3/0,1) (v/v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Obrázek 13 znázorňuje hodnoty rozlišení v závislosti na složení použité mobilní fáze pro separované analyty.

Z Obrázku 13 je patrné, že pro chirální separaci *N*-blokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu je vhodnější vyšší množství triethylaminu v mobilní fázi oproti kyselině octové. V těchto mobilních fázích jsou hodnoty rozlišení nejvyšší a zároveň velmi podobné hodnotám rozlišení pro mobilní fáze s objemovým poměrem triethylaminu a kyseliny octové 1:1. Nižší hodnoty rozlišení pozorujeme u nižšího množství triethylaminu v mobilní fázi.



Obr. 13. Závislost rozlišení (*R*) na složení MF pro separované analyty

4.1.3 Porovnání reverzního a polárně-organického módu na koloně Chirobiotic® T

Ze získaných výsledků je patrné, že použití reverzního módu na koloně Chirobiotic® T je vhodné pro většinu látek ze studovaného souboru analytů. Mobilní fáze složená z methanolu a 20 mM octanového pufru o pH 4,00 poskytovala velmi dobré retenční časy a taktéž hodnoty rozlišení a asymetrie u separovaných enantiomerů, oproti polárně-organickému módu, kdy došlo k enantioseparaci pouze *N*-blokových derivátů D,L-Fenylalaninu kromě Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylesteru. Polárně-organický mód tedy není vhodný pro *N*-neblokované deriváty D,L-Fenylalaninu, methylovaný derivát D,L-Tyrosinu a ani pro D,L-Tyrosin.

4.2 Kolona Chirobiotic® T2

4.2.1 Separace v reverzním módu

Kolona Chirobiotic® T2 byla vybrána pro porovnání separační účinnosti obou teikoplaninových stacionárních fází. Dalším důvodem byl možný pozitivní vliv na enantioseparace aminokyselin z důvodu vyššího pokrytí silikagelového nosiče chirálním selektorem.

V RP módu byly použity mobilní fáze obsahující methanol a 20mM octanový pufr o pH 4,00, který byl určen jako nejvhodnější pro chirální separace aminokyselin na koloně Chirobiotic® T.

Tabulka 16 shrnuje chromatografické parametry (částečně) separovaných látek. Pro analyt D,L-2-F-Fenylalanin a D,L-Tyrosin byla jako nejvhodnější vyhodnocena mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v). Pro α -Methyl-D,L-Tyrosin byla jako nejlépe vhodná vyhodnocena mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (60/40) (v/v). Enantiomery α -Methyl-D,L-Tyrosinu se nepodařilo rozdělit na koloně Chirobiotic® T za žádných podmínek ani v jednom použitém separačním módu. Nástřikem jednotlivých enantiomerů na kolonu bylo ověřeno eluční pořadí (L<D).

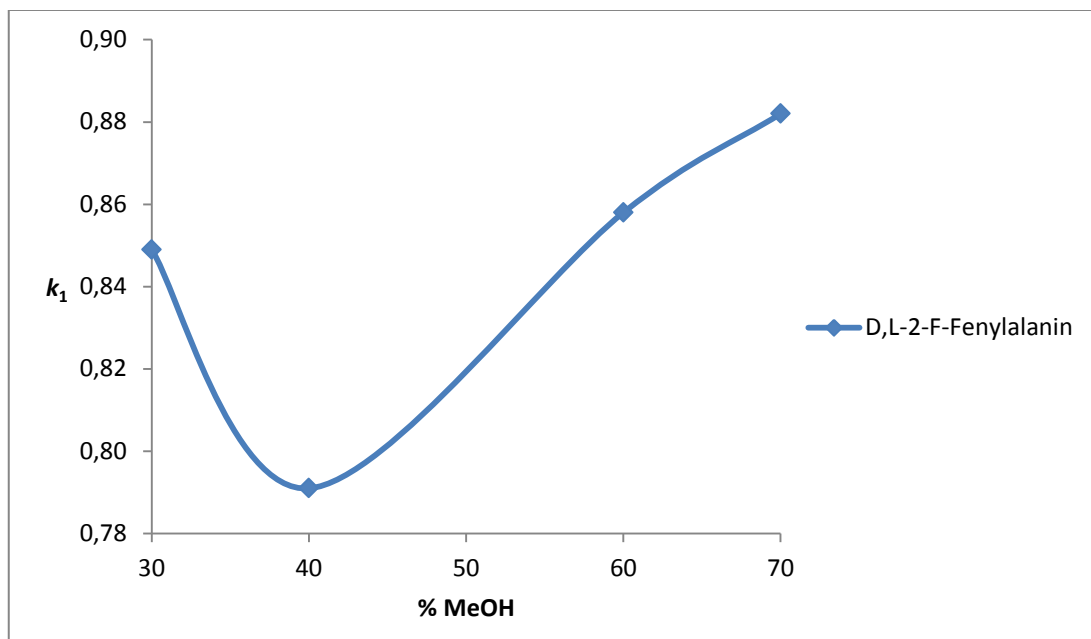
Tab. 16. Retenční faktor 1. eluujícího enantiomeru (k_1), selektivita (α) a rozlišení (R) separovaných látek za optimálních podmínek

Název analytu	k_1	α	R
D,L-2-F-Fenylalanin	0,882	1,151	0,610
α -Methyl-D,L-Tyrosin	0,680	1,332	1,040
D,L-Tyrosin	0,962	1,846	3,010

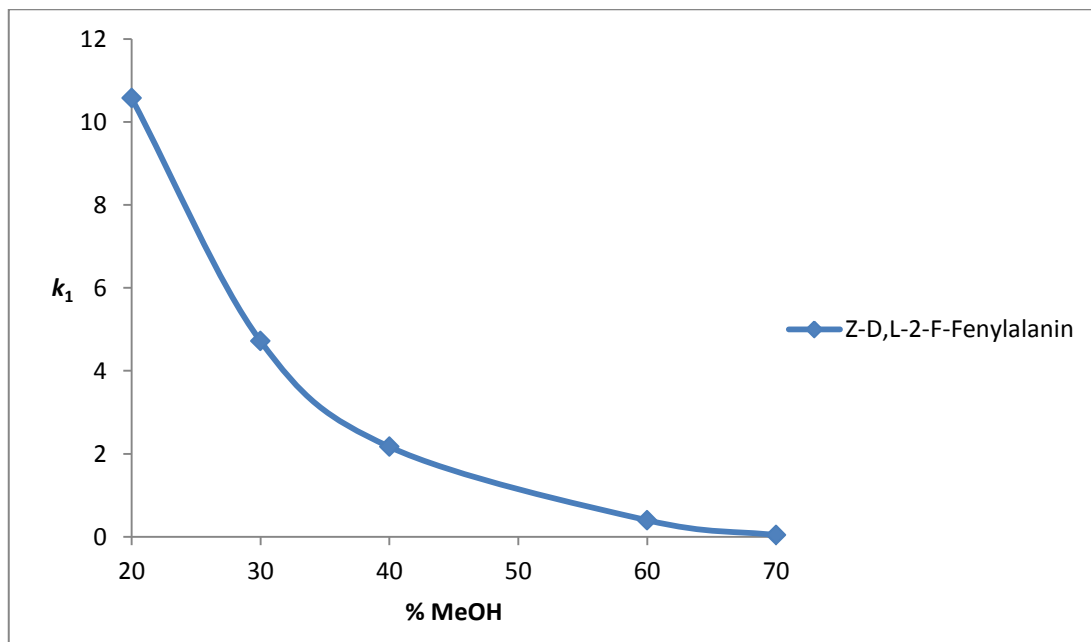
V RP módu došlo k částečné separaci u dvou látek a k úplné separaci pouze u jednoho analytu dle hodnot R v Tabulce 16.

Pro srovnání je zde zobrazena závislost retenčního faktoru L-enantiomeru na obsahu MeOH v MF pro D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-2-F-Fenylalanin Obrázkem

14 a 15.



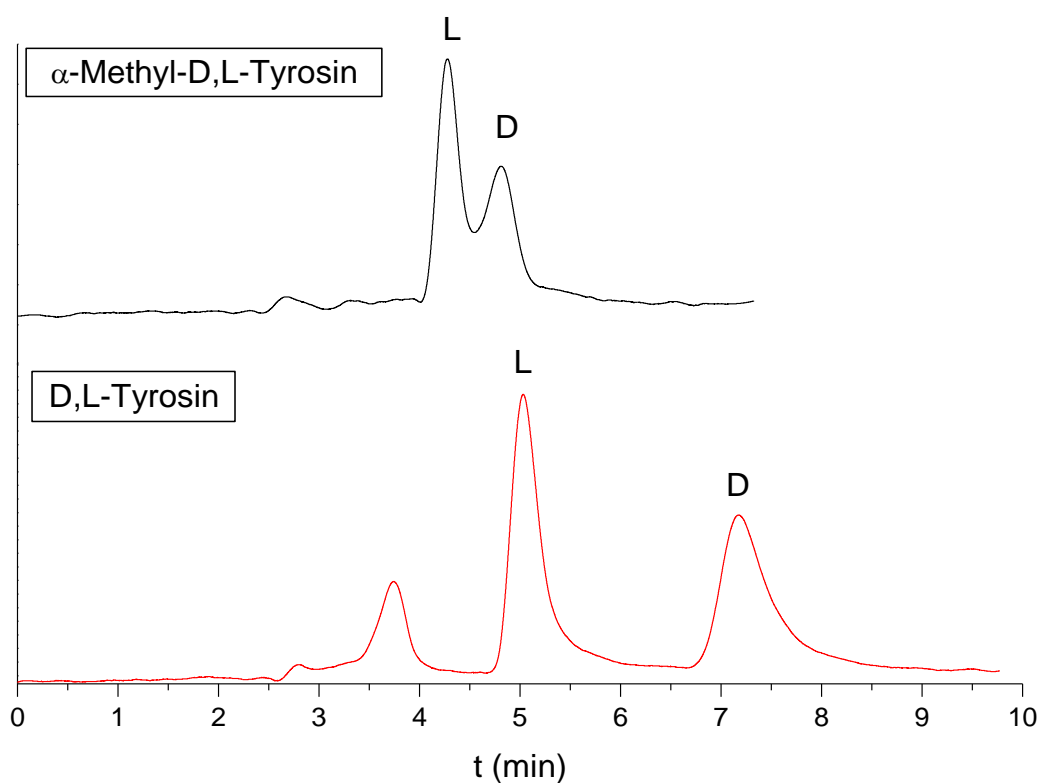
Obr. 14. Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru (k_1) na obsahu MeOH v MF pro D,L-2-F-Fenylalanin



Obr. 15. Závislost retenčního faktoru 1. elujícího enantiomeru (k_1) na obsahu MeOH v MF pro Z-D,L-2-F-Fenylalanin

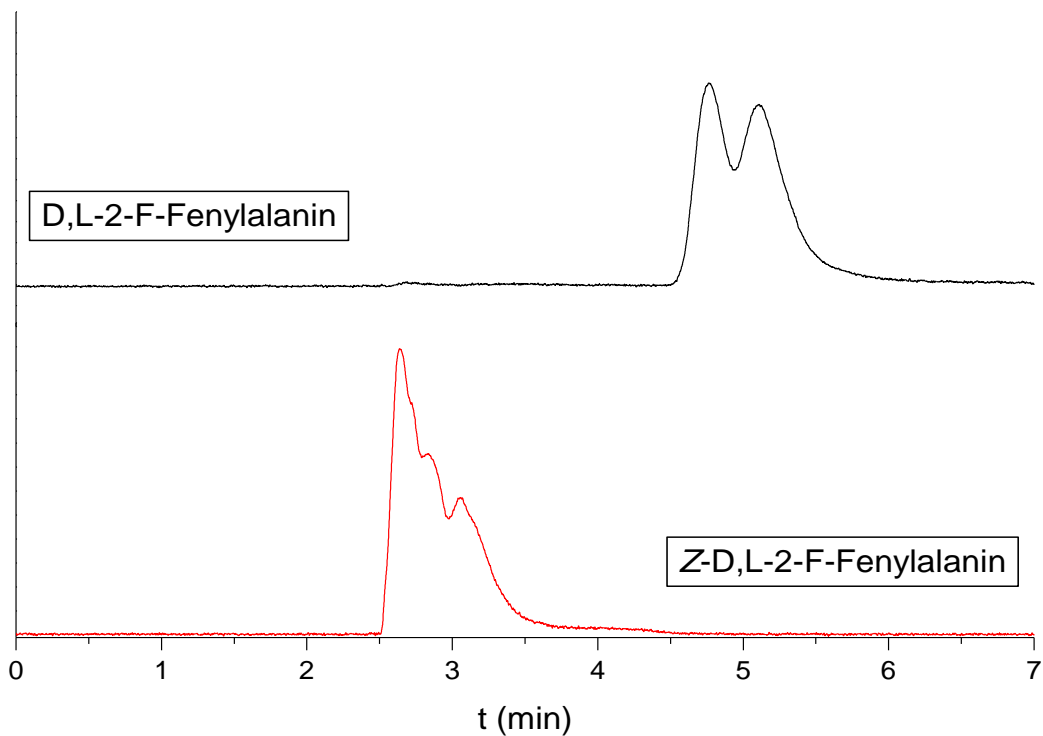
Z Obrázku 14 si lze všimnout „U-tvaru“ pro látku D,L-2-F-Fenylalanin. Obrázek 15 „U-tvar“ nevykazuje. Tato odlišnost je způsobena rozdílnou polaritou srovnávaných látek. Navázání nepolární Z-skupiny na D,L-2-F-Fenylalanin sníží polaritu této molekuly, která pak není vhodná pro separace v HILIC módu. Z těchto výsledků je patrné, že i kolona Chirobiotic[®] T2 je vhodná pro separace polárních látek v HILIC i RP módu. *N*-blokace patrně snižuje možnost separace analytu na koloně Chirobiotic[®] T2 i přes to, že se prodlužuje retence dané látky se snižujícím se objemovým zlomkem methanolu v mobilní fázi.

Obrázek 16 znázorňuje získané chromatogramy pro α -Methyl-D,L-Tyrosin a D,L-Tyrosin při použití nejvhodnějších podmínek pro separaci.



Obr. 16. Chromatogram separace α -Methyl-D,L-Tyrosinu a D,L-Tyrosinu, kolona Chirobiotic[®] T2, α -Methyl-D,L-Tyrosin MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (60/40) (v/v), D,L-Tyrosin MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Obrázek 17 srovnává získané chromatogramy pro D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-2-F-Fenylalanin při použití mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v).



Obr. 17. Chromatogram separace derivátů D,L-Fenylalaninu, kolona Chirobiotic[®] T2, D,L-2-F-Fenylalanin a Z-D,L-2-F-Fenylalanin MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Většinu enantiomerů analyzovaných látek se nepodařilo rozseparovat. *N*-blokové látky v tomto separačním systému vykazovaly prodlužující se retence se zvyšujícím se objemovým zlomkem methanolu v mobilní fázi, avšak *N*-neblokové analyty eluovaly ve velmi podobných retenčních časech ve všech použitých mobilních fázích.

Lze tedy říci, že byly nalezeny optimální podmínky separace v RP módu na koloně Chirobiotic[®] T2 pouze pro látku D,L-Tyrosin: mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 70/30 (v/v).

4.2.2 Separace v polárně-organickém módu

V PO módu byly použity mobilní fáze, které jsou uvedeny v Tabulce 7 (str. 25). Podařilo se rozseparovat všechny *N*-neblokované analyty. *N*-blokované analyty eluovaly ve velmi krátkých retenčních časech bez jakéhokoliv náznaku separace.

Tabulka 17 shrnuje chromatografické parametry za optimálních separačních podmínek. Pro látku α -Methyl-D,L-Tyrosin byla jako optimální vyhodnocena mobilní fáze MeOH/TEA/HAc 100/0,3/0,3 (v/v/v), pro D,L Tyrosin mobilní fáze MeOH/TEA/HAc 100/0,1/0,3 (v/v/v) a pro ostatní látky, které jsou uvedeny v Tabulce 17 mobilní fáze MeOH/TEA/HAc 100/0,1/0,5 (v/v/v).

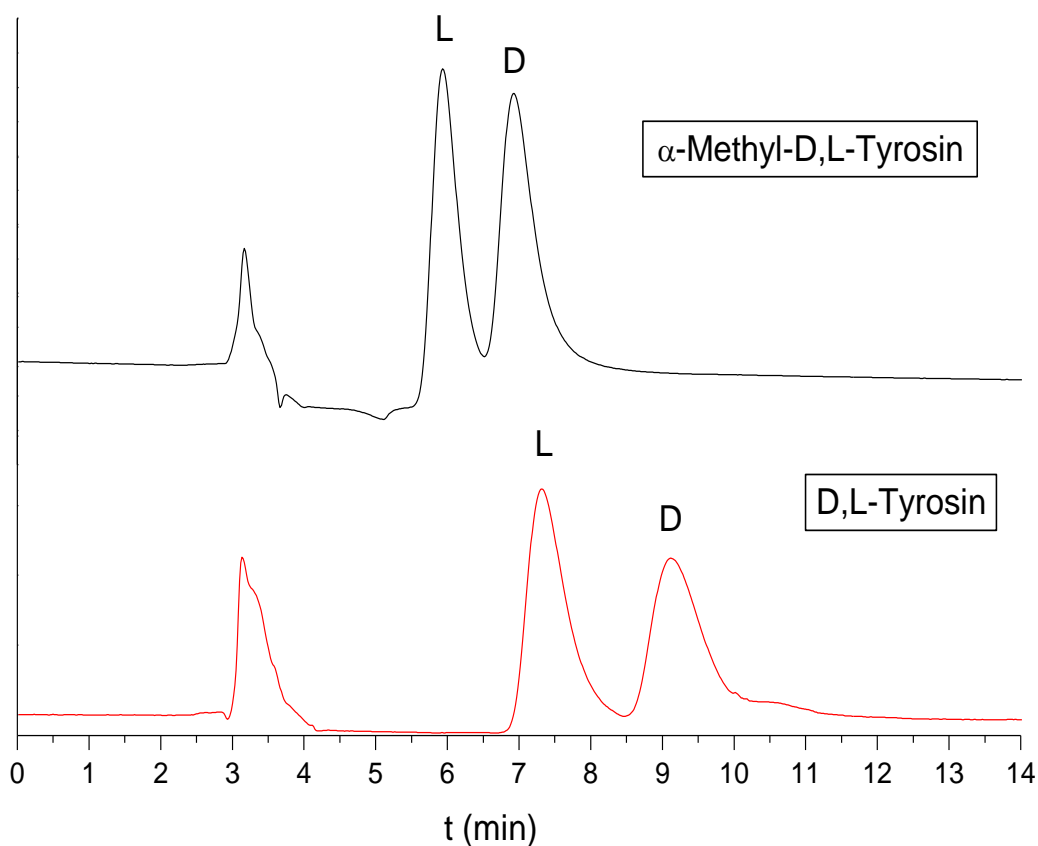
Tab. 17. Retenční faktor 1. elujícího enantiomeru (k_1), selektivita (α), rozlišení (R) a faktor asymetrie 1. a 2. elujícího enantiomeru (As_1) a (As_2) separovaných látek

Název analytu	k_1	α	R	As_1	As_2
D,L-4-F-Fenylalanin	1,722	1,380	1,940	1,903	2,094
D,L-2-F-Fenylalanin	1,472	1,381	1,906	1,923	1,946
D,L-4-Cl-Fenylalanin	2,100	1,314	1,607	1,979	-
D,L-Fenylalanin	1,778	1,374	1,862	2,057	2,180
α -Methyl-D,L-Tyrosin	1,339	1,291	1,286	-	-
D,L-Tyrosin	1,883	1,776	1,660	1,263	1,567

- hodnota As_1 či As_2 nebyla dostupná z důvodu neúplné separace na základní linii

Z Tabulky 17 vyplývá, že všechny *N*-neblokované analyzované látky kromě α -Methyl-D,L-Tyrosinu mají příznivé hodnoty rozlišení, separace u nich proběhla na základní linii.

Obrázek 18 zachycuje chromatogram enantioseparace D,L-Tyrosinu a jeho derivátu za optimálních podmínek.



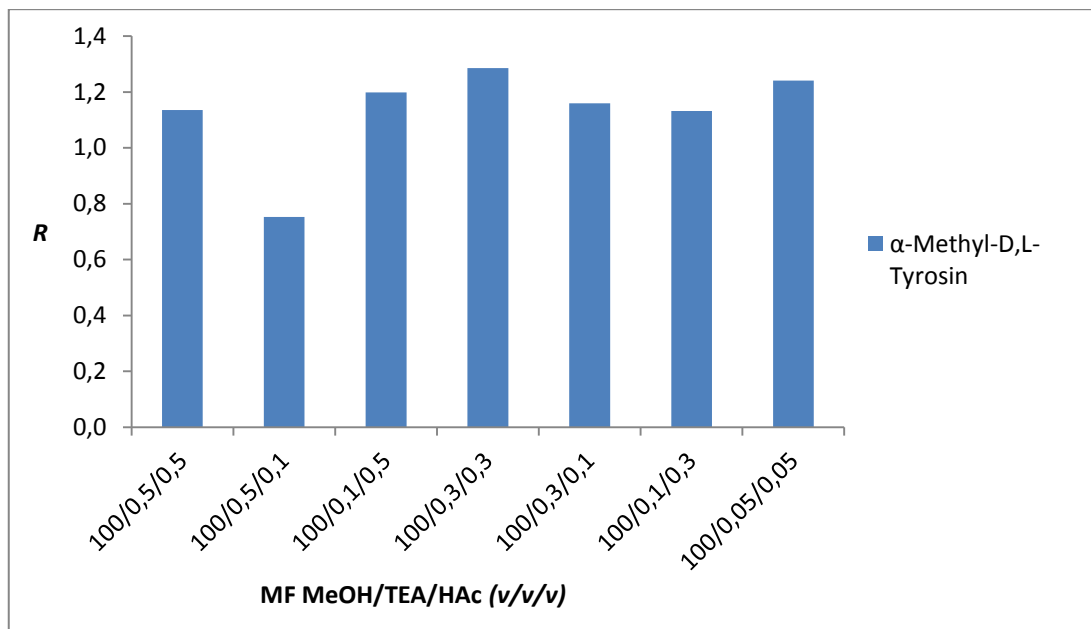
Obr. 18. Chromatogram separace α -Methyl-D,L-Tyrosinu a D,L-Tyrosinu, kolona Chirobiotic[®] T2, α -Methyl-D,L-Tyrosin MF MeOH/TEA/HAc (100/0,3/0,3) (v/v/v), D,L-Tyrosin MF MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,3) (v/v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Hodnoty asymetrie pro D,L-Tyrosin jsou trochu větší než 1. Pro analyt α -Methyl-D,L-Tyrosin nebyly hodnoty asymetrie dostupné z důvodu neúplného rozseparování na základní linii. Z Obrázku 18 je patrné, že později eluovaný D-enantiomer α -Methyl-D,L-Tyrosinu vykazuje trochu vyšší chvostování, než L-enantiomer.

Obrázek 19 zachycuje závislost rozlišení na složení mobilní fáze pro látku α -Methyl-D,L-Tyrosin.

Na základě Obrázku 19 lze říct, že se hodnoty rozlišení velmi podobají až na

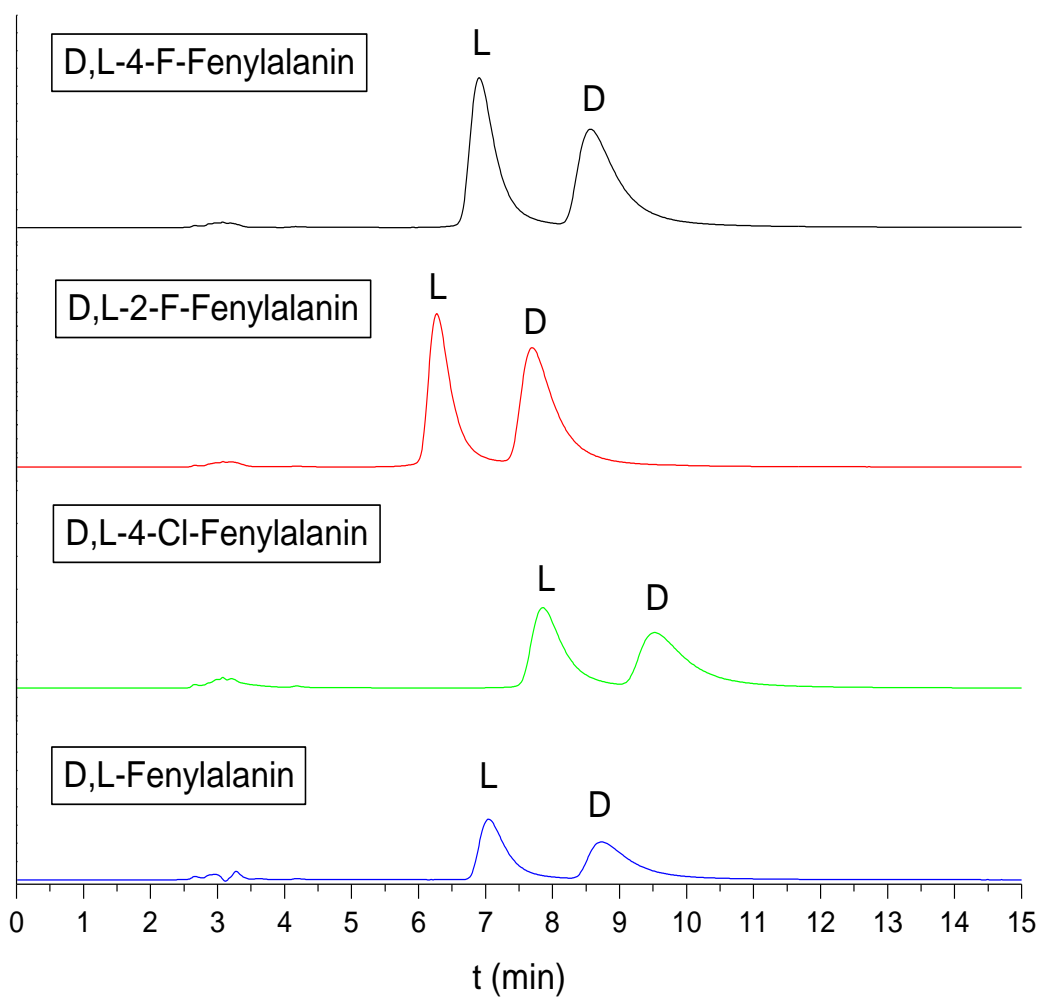
mobilní fázi MeOH/TEA/HAc 100/0,5/0,1 (v/v/v). Zde výrazně převyšující množství triethylaminu oproti kyselině octové má negativní vliv na chirální separaci tohoto analytu.



Obr. 19. Závislost rozlišení (R) na složení MF pro α -Methyl-D,L-Tyrosin

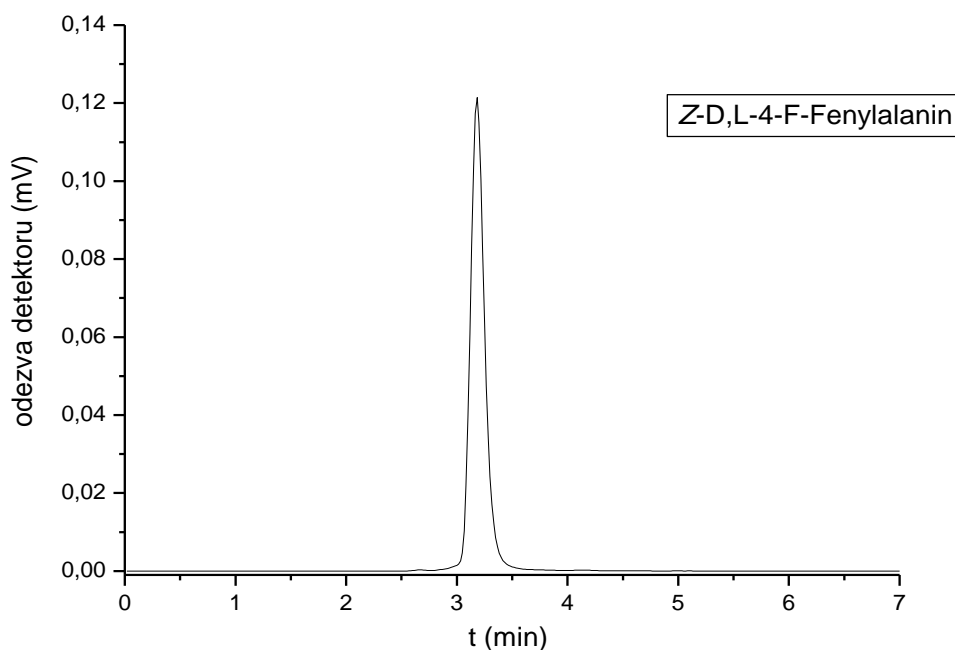
Obrázek 20 znázorňuje chromatogram separace D,L-Fenylalaninu a jeho derivátů za optimálních podmínek.

Z Obrázku 20 lze porovnat faktory asymetrií analyzovaných látek. U všech uvedených látek dochází k většímu rozmytí píku jak pro L-enantiomer, tak i pro D-enantiomer, tzv. chvostování je více znatelné v porovnání s D,L-Tyrosinem. Odpovídající jsou k tomuto tvrzení i hodnoty asymetrií uvedené v Tabulce 17 – pohybují se okolo hodnoty 2.



Obr. 20. Chromatogram separace D,L-Fenylalaninu a jeho derivátů, kolona Chirobiotic[®] T2, MF MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,5) (v/v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

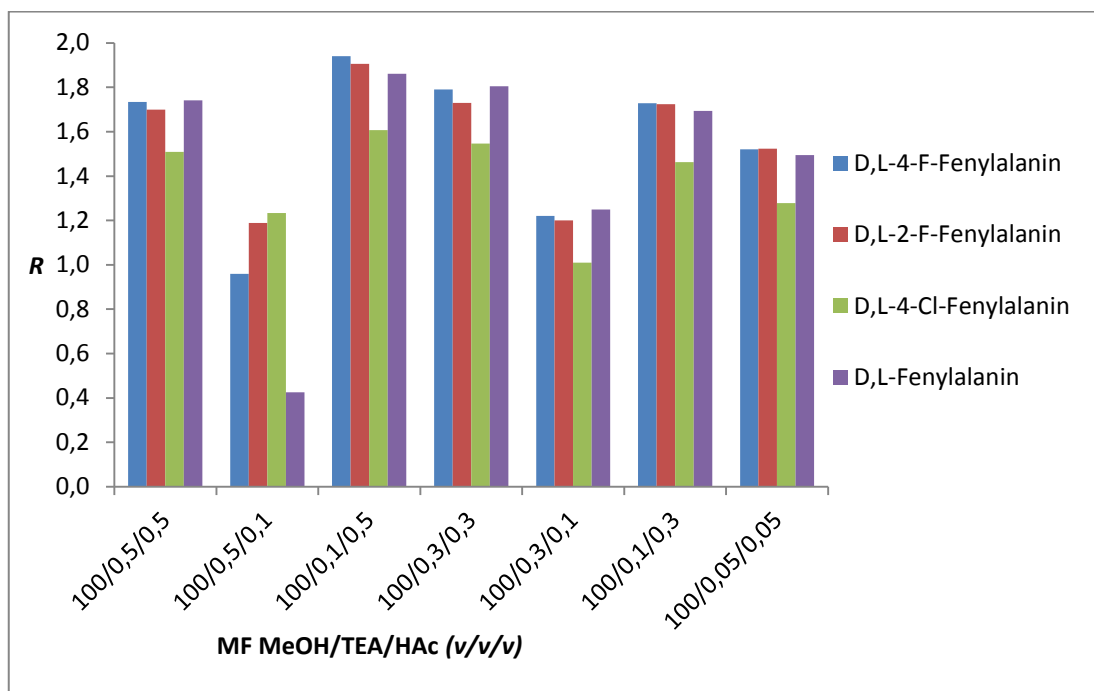
Pro srovnání je zde zobrazena analýza Z-D,L-4-F-Fenylalaninu Obrázkem 21, v mobilní fázi, ve které došlo k separaci D,L-Fenylalaninu a jeho derivátů na základní linii: mobilní fáze MeOH/TEA/HAc 100/0,1/0,5 (v/v/v). Veškeré separace *N*-blokovaných analytů napříč použitými mobilními fázemi jsou téměř totožné s uvedeným chromatogramem (tzn. nízká retence, lepší tvar píku, ale nedochází k separaci enantiomerů).



Obr. 21. Chromatogram separace Z-D,L-4-F-Fenylalaninu, kolona Chirobiotic[®] T2, MF MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,5) (v/v/v), průtok 1 ml/min, UV detekce $\lambda=254$ nm

Pro porovnání závislosti hodnot rozlišení na složení mobilní fáze pro D,L-Fenylalanin a jeho deriváty je zde uveden Obrázek 22.

Z Obrázku 22 je patrné, že pro separaci enantiomerů *N*-neblokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu a D,L-Fenylalanin bylo nevyhovující vyšší množství triethylaminu v mobilní fázi oproti kyselině octové. V těchto mobilních fázích jsou hodnoty rozlišení výrazně nižší než 1,5 a nedošlo tedy k separaci na základní linii. Mobilní fáze, které obsahovaly množství triethylaminu a kyseliny octové v objemovém poměru 1:1 vykazovaly příznivé hodnoty rozlišení až na mobilní fázi MeOH/TEA/HAc 100/0,05/0,05 (v/v/v), což může být právě způsobeno velmi malým přídatkem jak triethylaminu tak kyseliny octové do mobilní fáze. Z Obrázku 22 lze také vidět celkově nižší hodnoty rozlišení pro D,L-4-Cl-Fenylalanin kromě mobilní fáze MeOH/TEA/HAc 100/0,5/0,1 (v/v/v), v níž vykazuje nejvyšší hodnotu rozlišení ze všech látek (i když v této mobilní fázi mají všechny analyty hodnotu rozlišení menší než 1,5).



Obr. 22. Závislost rozlišení (R) na složení MF pro D,L-Fenylalanin a jeho deriváty

4.2.3 Porovnání reverzního a polárně-organického módu na koloně Chirobiotic® T2

Reverzní mód na této koloně nebyl příliš vhodný pro enantioseparaci jak *N*-blokových, tak *N*-neblokovaných derivátů D,L-Fenylalaninu a D,L-Fenylalanin při použití mobilních fází složených z methanolu a 20 mM octanového pufru o pH 4,00. Naproti tomu polárně-organický mód na koloně Chirobiotic® T2 je vhodný pro všechny *N*-neblokované deriváty D,L-Fenylalaninu a D,L-Fenylalanin. U těchto látek se podařilo nalézt optimální podmínky pro enantioseparaci.

Použití reverzního i polárně-organického módu na koloně Chirobiotic® T2 je vhodné pro D,L-Tyrosin. V reverzním módu se podařilo tyto enantiomery separovat na základní linii. V polárně-organickém módu došlo k enantioseparaci téměř na základní linii. U methylovaného derivátu D,L-Tyrosinu došlo k částečné separaci v obou použitých módech na koloně Chirobiotic® T2.

4.3 Porovnání kolon Chirobiotic® T a Chirobiotic® T2

Na základě získaných výsledků lze usuzovat, že kolona Chirobiotic® T je vhodnější než kolona Chirobiotic® T2 v reverzním separačním módu pro *N*-blokované i *N*-neblokované analyty. Kolona Chirobiotic® T poskytuje enantioseparaci na základní linii všech derivátů D,L-Fenylalaninu kromě Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylesteru, kdežto kolona Chirobiotic® T2 pouze částečnou enantioseparaci D,L-2-F-Fenylalaninu a u ostatních enantiomerů nedošlo ani k náznaku separace. Reverzní mód na obou kolonách je vhodný pro látku D,L-Tyrosin. Naproti tomu methylovaný derivát D,L-Tyrosinu se nepodařilo rozseparovat na koloně Chirobiotic® T, zatímco na koloně Chirobiotic® T2 došlo alespoň k částečné separaci.

Separace v polárně-organickém módu na koloně Chirobiotic® T je vhodná pouze pro *N*-blokované deriváty D,L-Fenylalaninu, přičemž pro separaci na základní linii je třeba vyšší množství triethylaminu oproti kyselině octové v mobilní fázi. Naproti tomu kolona Chirobiotic® T2 poskytuje separaci na základní linii pro *N*-neblokované deriváty D,L-Fenylalaninu i pro derivát D,L-Tyrosinu a D,L-Tyrosin. Přičemž množství triethylaminu v mobilní fázi musí být nižší oproti množství kyseliny octové.

5 Závěr

Chirální separace derivátů D,L-Fenylalaninu a D,L-Tyrosinu metodou HPLC byla provedena na kolonách Chirobiotic[®] T a Chirobiotic[®] T2 v reverzním a polárně-organickém módu. Byla zkoumána retence a enantioseparace analytů ve dvou různých separačních módech na dvou stacionárních fázích na bázi teikoplaninu.

Byly nalezeny optimální podmínky pro enantioseparaci na základní linii pro osm enantiomerů ze souboru deseti studovaných analytů.

Pro látku D,L-4-F-Fenylalanin je nejvíce vhodné užití RP módu na koloně Chirobiotic[®] T při použití mobilní fáze složené z methanolu a 20 mM octanového pufru o pH 4,00 v poměru (70/30) (v/v) či PO módu na koloně Chirobiotic[®] T2 při složení mobilní fáze MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,5) (v/v/v).

Kolona Chirobiotic[®] T je vhodná pro Z-D,L-4-F-Fenylalanin v RP (MF MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (80/20) (v/v)) i PO módu (MF MeOH/TEA/HAc (100/0,5/0,1) (v/v/v)).

Z-D,L-4-F-Fenylalanin-ethylester se nepodařilo rozdělit ani v jednom z použitých separačních módů na teikoplaninových CSP.

Optimální podmínky enantioseparace pro Z-D,L-3-F-Fenylalanin jsou následující: kolona Chirobiotic[®] T, reverzní mód a mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v), dále polárně-organický mód a mobilní fáze MeOH/TEA/HAc (100/0,3/0,1) (v/v/v).

Pro látky D,L-2-F-Fenylalanin, D,L-4-Cl-Fenylalanin a D,L-Fenylalanin byly jako nejvhodnější vyhodnoceny tyto podmínky: kolona Chirobiotic[®] T v reverzním separačním módu při použití mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v) a dále kolona Chirobiotic[®] T2 v polárně-organickém módu a mobilní fáze MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,5) (v/v/v).

Enantioseparace na základní linii Z-D,L-2-F-Fenylalaninu byla provedena při použití kolony Chirobiotic[®] T. Jako optimální byla v reverzním módu vyhodnocena mobilní fáze složená z methanolu a 20 mM octanového pufru o pH 4,00 v poměru (70/30) (v/v) a v polárně-organickém módu mobilní fáze obsahující MeOH/TEA/HAc (100/0,5/0,1) (v/v/v).

α -Methyl-D,L-Tyrosin se podařilo pouze částečně rozdělit na koloně Chirobiotic[®] T2 jak v reverzním, tak polárně-organickém módu. Nejvhodnější mobilní fáze v reverzním módu je MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (60/40) (v/v) a v polárně-organickém módu MeOH/TEA/HAc (100/0,3/0,3) (v/v/v).

Kolona Chirobiotic[®] T v reverzním módu při složení mobilní fáze MeOH/20 mM octanový pufr pH 4,00 (70/30) (v/v) je vhodná pro látku D,L-Tyrosin. Dále pak na koloně Chirobiotic[®] T2 byla pro enantioseparaci D,L-Tyrosinu vyhodnocena jako vhodná stejná mobilní fáze jako u kolony Chirobiotic[®] T v reverzním módu. Polárně-organický mód na koloně Chirobiotic[®] T2 je taktéž pro D,L-Tyrosin vhodný při použití mobilní fáze MeOH/TEA/HAc (100/0,1/0,3) (v/v/v).

Lze tedy shrnout, že chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu jsou vhodné pro chirální separace testovaných aminokyselin a jejich derivátů v RP a PO módech. Ze získaných výsledků je patrné, že kolony Chirobiotic[®] T a Chirobiotic[®] T2 jsou k sobě komplementární.

6 Použitá literatura

1. **I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter.** *HPLC separation of amino acid enantiomers and small peptides on macrocyclic antibiotic-based chiral stationary phases: A review.* J. Sep. Sci. 29, 2006. s. 1305-1321.
2. **M. Haroun, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin.** *Reversal of the enantiomeric elution order of some aromatic amino acids using reversed-phase chromatographic supports coated with the teicoplanin chiral selector.* Talanta 68, 2006. s. 1032-1036.
3. **E. Tesařová, Z. Bosáková.** *Comparison of enantioseparation of selected benzodiazepine and phenothiazine derivatives on chiral stationary phases based on β -cyclodextrin and macrocyclic antibiotics.* J. Sep.Sci. 26, 2003. s. 661-668.
4. **K. Petrussevska, M. A. Kuznetsov, K. Gedicke, V. Meshko, S. M. Staroverov, A. Seidel-Morgenstern.** *Chromatographic enantioseparation of amino acids using a new chiral stationary phase based on a macrocyclic glycopeptide antibiotic.* J. Sep. Sci. 29, 2006. s. 1447-1457.
5. **S. Srkalová, K. Kalíková, E. Tesařová.** *Výskyt a význam enantiomerů v potravinách.* Chem. Listy 102, 2008. s. 480-486.
6. **Cleaves, H. J.** *The origin of the biologically coded amino acids.* Journal of Theoretical Biology 263, 2010. s. 490-498.
7. **Vodrážka, Z.** *Biochemie.* Praha : Academia, 1999.
8. **F. Cava, M. A de Pedro, H. Lam, B. M. Davis, M. K. Waldor.** *Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids.* The EMBO Journal 30, 2011. s. 3442-3453.
9. **W. F. Visser, N. M. Verhoeven-Duif, R. Ophoffb, S. Bakker, L. W. Klomp, R. Berger, T. J. de Koninga.** *A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids.* J. Chromatogr. A 40, 2011. s. 7130-7136.
10. **M. Doležalová, M. Tkaczyková.** *HPLC enantioselective separation of aromatic amino and hydrazino acids on a teicoplanin stationary phase and the enantiomeric purity determination of L-isomers used as drugs.* Chirality 11, 1999. s. 394-403.
11. **J. S. Davies, G. C. Barrett.** *Amino acids, peptides and proteins.* Cambridge : The Royal Society of Chemistry, 2002.
12. **A. Hasuoka, Y. Nishikimi, Y. Nakayama, K. Kamiyama, M. Nakao, L. Miyagawa, O. Nishimura, M. Fujino.** *Synthesis and anti-Heliobacter pylori activity of*

pyloridicin derivatives - I. Structure-activity relationships on the terminal peptidic moiety. Journal of Antibiotics 55, 2002. s. 322-336.

13. **M. Schlauch, O. Kos, A. W. Frahm.** *Comparison of three chiral stationary phases with respect to their enantio- and diastereoselectivity for cyclic β -substituted α -amino acids.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 27, 2002. s. 409-419.

14. **A. Péter, A. Árki, E. Vékes, D. Tourwé, L. Lázár, D. W. Armstrong.** *Direct and indirect high-performance liquid chromatographic enantioseparation of β -amino acids.* J. Chromatogr. A 1031, 2004. s. 171-178.

15. **H. Noda, M. Niwa, S. Yamamura.** *Biomimetic oxidation of methyl 3,5-dibromo-4-hydroxyphenylpyruvate oxime and related phenols.* Tetrahedron Letters 22, 1981. s. 3247-3248.

16. **E. Tesařová, Z. Bosáková, V. Pacáková.** *Comparison of enantioselective separation of *N*-tert.-butyloxycarbonyl amino acids and their non-blocked analogues on teicoplanin-based chiral stationary phase.* J. Chromatogr. A 838, 1999. s. 121-129.

17. **E. Tesařová, Z. Bosáková, I. Zusková.** *Enantioseparation of selected *N*-tert.-butyloxycarbonyl amino acids in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with a teicoplanin chiral selector.* J. Chromatogr. A 879, 2000. s. 147-156.

18. **J. Sobotníková, Z. Bosáková, R. Čabala, P. Coufal, V. Pacáková, K. Štulík.** *Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře Analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.* Chem. Listy 104, 2010. s. 1226-1231.

19. **Červinka, O.** *Chiralita a pojmy s ní související.* Chem. Listy 93, 1999. s. 294-305.

20. **E. L. Eliel, S. H. Wilen, L.N. Mander.** *Stereochemistry of organic compounds.* New York : Wiley, 1994.

21. **C. Bertucci, D. Tedesco.** *Advantages of electronic circular dichroism detection for the stereochemical analysis and characterization of drugs and natural products by liquid chromatography.* J. Chromatogr. A 1269, 2012. s. 69-81.

22. **M. Urbanová, V. Setnička, K. Volka.** *Spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu jako nový nástroj strukturní analýzy.* Chem. Listy 96, 2002. s. 301-304.

23. **Kejnovská, I.** *Strukturní vlastnosti DNA studované pomocí cirkulárního dichroismu.* Biologické listy 68, 2003. s. 192-195.

24. **B. Ranjbar, P. Gill.** *Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review.* Chem. Biol. Drug. Des. 74, 2009. s. 101-120.

25. **G. Magyarfalvi, G. Tarczay, E. Vass.** *Vibrational circular dichroism*. *Comput. Mol. Sci.* 1, 2011. s. 403-425.
26. **Pacák, J.** *Jak porozumět organické chemii*. Praha : Karolinum, 1997.
27. **Kolektiv autorů.** *Biochemie - základní kurz*. Praha : Karolinum, 2009.
28. **D. Voet, J. G. Voet.** *Biochemistry*. New York : Wiley, 1994.
29. **Patočka, J.** *Beta-aminokyseliny a jejich přírodní biologicky aktivní deriváty*. *Vojenské zdravotnické listy* 3, 2010. s. 114-118.
30. **A. Kuhl, M. G. Hahn, M. Dumić, J. Mittendorf.** *Alicyclic β -amino acids in medicinal chemistry*. *Amino Acids* 29, 2005. s. 89-100.
31. **I. Ali, K. Kumerer, H. Y. Aboul-Enein.** *Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis*. *Chromatographia* 63, 2006. s. 295-307.
32. **Kolektiv autorů.** *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha : 2006.
33. **M. Tang, J. Zhang, S. Zhuang, W. Liu.** *Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation*. *Trends in Analytical Chemistry* 39, 2012. s. 180-194.
34. **M. G. Schmid, G. Gübitz.** *Enantioseparation by chromatographic and electromigration techniques using ligand-exchange as chiral separation principle*. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 2011. s. 2305-2316.
35. **P. Sun, D. W. Armstrong.** *Effective enantiomeric separation of racemic primary amines by the isopropyl carbamate-cyclofructan β chiral stationary phase*. *J. Chromatogr. A* 1217, 2010. s. 4904-4918.
36. **I. Ilisz, A. Aranyi, Z. Pataj, A. Péter.** *Recent advantages in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 69, 2012. s. 28-41.
37. **J. Koidl, H. Hödl, M. G. Schmid, B. Neubauer, M. Konrad, S. Petschauer, G. Gübitz.** *Enantiorecognition of triiodothyronine and thyroxine enantiomers using different chiral selectors by HPLC and micro-HPLC*. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 2008. s. 1254-1260.
38. **B. Shen, D. Zhang, X. Yu, W. Guo, Y. Han, X. Xu.** *Evaluation and comparison of a 3,5-Dimethylphenyl isocyanate teicoplanin with phenyl isocyanate teicoplanin chiral stationary phase using RP-HPLC*. *Chin. J. Chem.* 30, 2012. s. 157-162.
39. **I. Ilisz, R. Berkecz, A. Péter.** *Retention mechanism of high-performance liquid*

chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. J. Chromatogr. A, 2009. s. 1845-1860.

40. **T. Gondová, J. Petrovaj, P. Kutschy, Z. Čurillová, A. Salayová, M. Fabián, D. W. Armstrong.** *Enantioseparation of novel amino analogs of indole phytoalexins on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phase.* Chromatographia 74, 2011. s. 751-757.

41. **A. Péter, R. Török, D. W. Armstrong.** *Direct high-performance liquid chromatographic separation of unusual secondary amino acids and a comparison of the performances of Chirobiotic T and TAG columns.* J. Chromatogr. A 1057, 2004. s. 229-235.

42. **Skold, O.** *Antibiotics and antibiotic resistance.* New York : Wiley, 2011.

43. **T. L. Xiao, E. Tesařová, J. L. Anderson, M. Egger, D. W. Armstrong.** *Evaluation and comparison of a methylated teicoplanin aglycone to teicoplanin aglycone and natural teicoplanin chiral stationary phases.* J. Sep. Sci. 29, 2006. s. 429-445.

44. **K. Kalíková, J. Lokajová, E. Tesařová.** *Linear free energy relationship as a tool for characterization of three teicoplanin-based chiral stationary phases under various mobile phase compositions.* J. Sep. Sci. 29, 2006. s. 1476-1485.

45. **M. Honetschlägerová-Vadinská, S. Srkalová, Z. Bosáková, P. Coufal, E. Tesařová.** *Comparison of enantioselective HPLC separation of structurally diverse compounds on chiral stationary phases with different teicoplanin coverage and distinct linkage chemistry.* J. Sep. Sci. 32, 2009. s. 1704-1711.

46. **Z. Pataj, I. Ilisz, R. Berkecz, A. Misicka, D. Tymecka, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter.** *Comparison of performance of Chirobiotic T, T2 and TAG columns in the separation of β^2 - and β^3 - homoamino acids.* J. Sep. Sci. 31, 2008. s. 3688-3697.

47. **J. B. Xu, D. T. Zhang, B. C. Shen, X. Z. XU.** *Enantioseparation of seven amino alcohols on teicoplanin chiral column.* Chin. J. Anal. Chem. 35, 2007. s. 55-60.

48. **X. He, R. Lin, H. He, M. Sun, D. Xiao.** *Chiral separation of ketoprofen on a Chirobiotic T column and its chiral recognition mechanisms.* Chromatographia 75, 2012. s. 1355-1363.

49. **Coufal, P.** *Separáční metody.* 2004.

50. **A. Péter, A. Árki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong.** *Comparison of the separation efficiencies of Chirobiotic T and TAG columns in the separation of unusual amino acids.* J. Chromatogr. A 1031, 2004. s. 159-170.

51. **A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D. W. Armstrong.** *Facile liquid chromatographic enantioresolution of native amino acids and peptides using a teicoplanin chiral stationary phase.* J. Chromatogr. A 731, 1996. s. 123-137.
52. **Claessens, H. A.** *Characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography: column testing, classification and chemical stability.* Universiteit Eindhoven, 1999.
53. **Berthod, A.** *Chiral recognition mechanisms with macrocyclic glycopeptide selectors.* Chirality 21, 2009. s. 167-175.
54. **M. Schlauch, A. W. Frahm.** *Enantiomeric and diastereomeric high-performance liquid chromatographic separation of cyclic β -substituted α -amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase.* J. Chromatogr. A 868, 2000. s. 197-207.
55. **A. Péter, G. Török, D. W. Armstrong.** *High-performance liquid chromatographic separation of enantiomers of unusual amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase.* J. Chromatogr. A 793, 1998. s. 283-296.
56. **A. Péter, E. Olajos, R. Casimir, D. Tourwé, Q. B. Broxterman, B. Kaptein, D. W. Armstrong.** *High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of unusual α -amino acid analogues.* J. Chromatogr. A 871, 2005. s. 105-113.
57. **A. Péter, E. Véles, L. Gera, J. M. Stewart, D. W. Armstrong.** *A comparison of the direct and indirect LC methods for separating enantiomers of unusual glycine and alanine amino acid analogues.* Chromatographia 56, 2002. s. 79-89.
58. **K. H. Ekkborg-Ott, Y. Liu, D. W. Armstrong.** *Highly enantioselective HPLC separation using the covalently bonded macrocyclic antibiotic, Ristocetin A, chiral stationary phase.* Chirality 10, 1998. s. 434-483.
59. **R. Berkecz, R. Török, I. Ilisz, E. Forró, F. Fülöp, D. W. Armstrong, A. Péter.** *LC enantioseparation of β -lactam and β -amino acid stereoisomers and a comparison of macrocyclic glycopeptide- and β -cyclodextrin-based columns.* Chromatographia 63, 2006. s. 37-43.
60. **A. Cavazzini, G. Nadalini, F. Dondi, F. Gasparrini, A. Ciogli, C. Villani.** *Study of mechanisms of chiral discrimination of amino acids and their derivatives on a teicoplanin-based chiral stationary phase.* J. Chromatogr. A 1031, 2004. s. 143-158.
61. **P. Y. Yu, H. S. Wu.** *Simultaneous analysis of enantiomeric composition of amino acids and N-acetyl-amino acids by enantioselective chromatography.* Chirality 13, 2001. s. 231-235.