

77

# Univerzita Karlova v Praze

## Přírodovědecká fakulta

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praha 2006

Simona Srkalová

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Chemie životního prostředí

OPTICKÉ IZOMERY  
V POTRAVINÁCH

Bakalářská práce

Praha 2006

Simona Srkalová

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Evy Tesařové, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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.....5.6.2006.....

.....*Simona Zelazná*.....

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě velice děkuji své školitelce, Doc. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za čas, který mi věnovala během odborných konzultací, za poskytnutí literatury a důležitých informací a za podnětné rady a připomínky.

Dále moc děkuji svým rodičům za jejich velkou podporu a nesmírnou obětavost.

# OBSAH

Seznam zkratk	6
<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Základní pojmy</b>	<b>8</b>
<b>3. Rozdílné vlastnosti a biologické účinky enantiomerů</b>	<b>11</b>
<b>4. Význam enantiomerů v potravinách</b>	<b>13</b>
4.1 D-aminokyseliny	13
4.1.1 D-aminokyseliny: ukazatele podmínek zpracování	13
4.1.2 D-aminokyseliny v nekvašených a kvašených potravinách	14
4.1.3 Význam D-aminokyselin z hlediska výživy	16
4.2 Aminokyselina theanin	16
4.3 D- a L-mléčná kyselina ve kvašených potravinách	17
4.4 Chuťové a vonné složky	17
4.4.1 Laktony	18
4.4.2 Karboxylové kyseliny a estery s rozvětveným řetězcem	19
4.4.3 Ketony, alkoholy a ethery	19
4.4.4 Terpenoidy	20
4.4.5 Sloučeniny obsahující síru	20
4.4.6 Kyselina glutamová	21
4.5 Vitamíny	21
<b>5. Analytické metody separace enantiomerů</b>	<b>23</b>
5.1 Základní principy chirální separace	24
5.1.1 Nepřímé separační metody	24
5.1.2 Přímé separační metody	24
5.2 Metody používané pro separaci enantiomerů	25
5.2.1 Chromatografické metody	25
5.2.1.1 Plynová chromatografie	25
5.2.1.2 Kapalinová chromatografie	26
5.2.2 Elektromigrační metody	27
5.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza	27
<b>6. Enantioselektivní separace složek potravin</b>	<b>29</b>
6.1 Příklady analýzy vybraných chirálních složek potravin	29

6.1.1 Aminokyseliny.....	29
6.1.2 Sacharidy.....	30
6.1.3 Některé další analyty.....	31
<b>7. Závěr.....</b>	<b>32</b>
Seznam literatury.....	33

## SEZNAM ZKRATEK

CIP	Cahn-Ingold-Prelog
US FDA	US Food and Drug Administration
MSG	Monosodium salt of glutamic acid (sodná sůl kyseliny glutamové)
GC	Plynová chromatografie
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
LC	Kapalinová chromatografie
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
CSP	Chirální stacionární fáze
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
MCE	Micelární kapilární elektroforéza
CEC	Kapilární elektrochromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
DNS-Cl	Dansyl chlorid
DNB-Cl	Dinitrobenzoyl chlorid
FMOC-Cl	<i>N</i> -fluorenylmethoxykarbonyl chlorid
FMOC-Gly-Cl	<i>N</i> -fluorenylmethoxykarbonyl-L-glycyl chlorid
AQC	6-amino-quinolyl- <i>N</i> -hydroxysukcinimidylkarbamát
CE	Kapilární elektroforéza

# 1. ÚVOD

Problematika chiralit je nesmírně zajímavá a také velmi důležitá. Většina přírodních látek je chirálních. Donedávna však význam stereochemie nebyl v přírodních vědách příliš brán v úvahu, ačkoliv se enantiomery vyznačují rozdíly nejen ve své struktuře, ale také v chuti, vůni, biologických a fyziologických vlastnostech, a bohužel i v toxicitě. Příkladem je užívání látky thalidomidu v 50. a na počátku 60. let minulého století. Thalidomid byl nasazen ve 48 zemích jako lék na ranní nevolnosti pro těhotné ženy, vlivem jeho užívání se však narodilo 12 000 postižených dětí. R-thalidomid má sice sedativní účinky, avšak jeho S-enantiomer je vysoce teratogenní.

V posledních desetiletích se s rozvojem analytických metod dostalo enantiomerům již větší pozornosti. Mnoho optických izomerů je významnými složkami potravin. Jsou odpovědné např. za jejich chuť, vůni a nutriční hodnotu. Jsou však také důležitými a spolehlivými ukazateli podmínek zpracování, úpravy a skladování potravin, přítomnosti nežádoucích bakterií a syntetických příměsí, tedy souhrnně řečeno celkové kvality potravin.

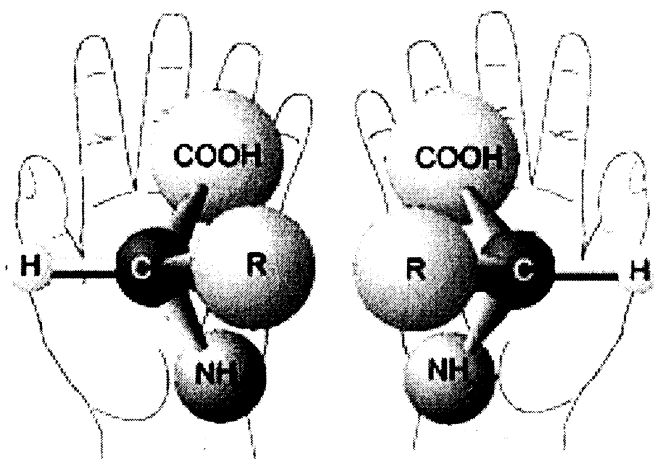
Cílem této práce je poskytnout základní přehled o nejdůležitějších chirálních potravinových složkách a jejich významu v hodnocení kvality potravin. V úvodní kapitole jsou definovány základní termíny týkající se chirálních sloučenin. V následující kapitole jsou uvedeny některé příklady, které demonstrují rozdílné vlastnosti a biologické účinky enantiomerů. Závěrečné kapitoly jsou věnovány přehledu metod, kterými jsou optické izomery v potravinách analyzovány.



## 2. ZÁKLADNÍ POJMY

*Enantiomery*, jiným názvem optické izomery, jsou prostorové izomery, které mají stejnou chemickou strukturu, ale je mezi nimi vztah jako mezi předmětem a jeho zrcadlovým obrazem. Tyto molekuly mají v izotropickém (achirálním) prostředí stejné fyzikální a chemické vlastnosti (teplotu tání, teplotu varu, rozpustnost, spektrum, reaktivitu). Výjimkou je jejich optická aktivita, nebo-li schopnost otáčet rovinou polarizovaného světla.<sup>1</sup> Enantiomery otáčejí rovinu polarizovaného světla o stejný úhel, ale v opačném směru.<sup>2</sup> Tento úhel je měřitelná fyzikální veličina a označuje se jako optická otáčivost (optická rotace). Naměřený úhel závisí na podmínkách měření (koncentraci vzorku, délce kyvety, vlnové délce použitého světla, použitým rozpouštědlem, teplotě). Enantiomery se liší v chirálním prostředí. Jsou jinak rozpustné v chirálním rozpouštědle, jinak se chovají vůči enzymům a chirálním činidlům.<sup>3</sup>

*Opticky aktivní* jsou látky, které jsou asymetrické.<sup>1,2,4</sup> Takové látky nemají v žádné své konformaci prvek symetrie a nazývají se chirální. Samotné slovo *chiralita* je odvozeno ze starořeckého slova *chiros* – dlaň<sup>4</sup> (viz Obr. 1).



Obr. 1 Názorná ukázka chiraloty – vzorce enantiomerů aminokyseliny

Symetrie molekuly je popsána pomocí operací symetrie podle odpovídajících *prvků symetrie*. Takovými prvky jsou jednoduchá rotační osa symetrie, rovina symetrie, střed symetrie a rotačně-reflexní osa. Podle těchto prvků jsou pak prováděny operace symetrie, tedy otáčení kolem osy, zrcadlení v rovině symetrie, inverze kolem středu symetrie a otáčení kolem osy se současným zrcadlením v rovině kolmé na osu otáčení. V molekule může být i více prvků symetrie, které pak vytvářejí grupu.<sup>4</sup>

*Asymetrie*, jako vlastnost opticky aktivní látky, může být středová, axiální (osová) a planární (rovinná). Látky se středovou asymetrií obsahují *stereogenní centrum*, nebo-li asymetrický atom (obvykle atom C, méně často atomy P, N, S, Si aj.).<sup>1</sup> Takový atom je označován jako střed chiralit.<sup>4</sup> Uspořádání atomů kolem stereogenního centra je znázorňováno pomocí vzorců ve Fischerově projekci<sup>5,2,4</sup>, která byla původně použita pro sacharidy.<sup>1</sup> Podle této projekce je hlavní řetězec orientován svisle, atom s nejnižším lokantem je nahoře.<sup>4</sup> Dvě vazby, které vycházejí z asymetrického atomu vertikálně, v prostoru směřují dozadu (za rovinu nákresny), dvě vazby vycházející z asymetrického atomu horizontálně pak v prostoru směřují dopředu (před rovinu nákresny).<sup>2</sup> Podle Fischerovy projekce se absolutní konfigurace na asymetrickém uhlíku vyjadřuje pomocí označení D- a L-<sup>1,2,4</sup> a dosud se používá u sacharidů, aminokyselin a peptidů.<sup>4</sup> U ostatních enantiomerů se absolutní konfigurace vyjadřuje pomocí konvence podle autorů Cahn, Ingolda, a Preloga (CIP systém), která používá označení R- a S-.<sup>6</sup> Pokud molekula obsahuje více stereogenních center, CIP systém se aplikuje na každé toto centrum chiralit a konfigurace molekuly se vyjadřuje souborem R a S afixů. Stereogenní centra, která mají známou pouze relativní konfiguraci, se označují afixy R\* nebo S\*.<sup>4</sup> Relativní konfigurace označuje pouze postavení jednoho substituentu vůči jinému.<sup>3</sup> V molekule může být přítomno více center chiralit, buď stejných, nebo strukturně různých. Pokud však molekula obsahuje stejný počet strukturně totožných center chiralit opačného smyslu a není zde přítomen další nepárový střed chiralit, je celá molekula achirální.<sup>4</sup>

Osová a rovinná chiralita je způsobena prostorově omezenou rotací molekuly podél chemické vazby.<sup>1</sup> Osově chirální jsou stereoizomery, které mají neplanárně uspořádané čtyři skupiny v párech kolem osy chiralit. Příkladem takových látek jsou alleny, alkylicykloalkany, spiranové sloučeniny, adamantoidy a diaryly. Pro rovinnou chiralitu platí podobný případ. Rovinou chiralit je ta rovina, v níž leží největší počet atomů. Příkladem může být (E)-cyklookten, monosubstituované paracyklofany nebo chirální metalloceny.<sup>4</sup>

*Helicita* je zvláštní případ chiralit u molekul se šroubovicovitou strukturou.<sup>1,4</sup>

Enantiomery se rozlišují v názvu sloučenin znaménkem (+) (nebo písmenem *d*), pokud jsou pravotočivé nebo znaménkem (–) (písmenem *l*), které se vztahuje k levotočivosti.<sup>1</sup> Tyto afixy se tedy vztahují ke smyslu otáčení roviny polarizovaného světla definované vlnové délkou<sup>4</sup> (nejčastěji při sodíkové čáře, 589,3 nm<sup>1</sup>).

Prostorové izomery, které nejsou enantiomery, se nazývají *diastereoizomery*, případně *epimery*.<sup>4</sup> Diastereoizomery jsou izomery, které se neliší na všech centrech chiralit.<sup>3</sup> Epimery jsou sloučeniny, které se liší pouze na jednom asymetrickém atomu.<sup>2</sup>

*Meso*-sloučeninami jsou nazývány molekuly, které obsahují stejný počet enantiomerních identicky vázaných skupin. Neobsahují žádné další chirální skupiny, mají tedy rovinu symetrie a nejsou chirální.<sup>4</sup>

Směs dvou enantiomerů o stejné koncentraci, bez ohledu na jejich skupenství, se nazývá *racemát*.<sup>2,4</sup> Enantiomery mají stejnou absolutní hodnotu optické otáčivosti, ale liší se smyslem otáčení. V racemické směsi se příspěvky obou forem vzájemně ruší, proto má racemát nulovou hodnotu optické rotace.<sup>3</sup>

Některé monosacharidy existují v cyklické poloacetalové formě, která vzniká ve vodných roztocích reakcí karbonylové skupiny s některou vzdálenější hydroxylovou skupinou. Tato reakce probíhá intramolekulárně. V molekule poloacetalu se původní karbonylový uhlík stává chirální a vzniká tak nový asymetrický atom. Molekuly, které se liší pouze konfigurací poloacetalového hydroxyly, se nazývají *anomery*. Nejedná se o enantiomery, ale o diastereoizomery.<sup>1</sup>

Racemizace je proces, při kterém nevratně vzniká z výchozí neracemické chirální sloučeniny racemát.

Enantiomerizace je děj přeměny jednoho enantiomeru v druhý.

Diastereoizomerizace je přeměna jednoho diastereoizomeru v druhý.

Epimerizace je proces, při kterém dochází ke změně konfigurace na jednoduchém stereogenním centru.<sup>4</sup>

### 3. ROZDÍLNÉ VLASTNOSTI A BIOLOGICKÉ ÚČINKY ENANTIOMERŮ

Již v polovině 19. století bylo známo, že enantiomery mají rozdílné biologické účinky. Avšak až v posledních několika desetiletích se v biologických vědách objevil hlubší zájem o stereochemii a chirální látky. V moderní době dále narůstá zájem o studie, které se zabývají chováním opticky aktivních látek.<sup>1</sup>

Velké množství přírodních látek se vyskytuje ve formě enantiomerů. Živé organismy jsou vlastně složitým systémem složeným z chirálních sloučenin.<sup>1</sup> Obecně se předpokládá, že přírodní makromolekuly jsou 'homochirální', to znamená, že obsahují pouze stereogenní centra se stejnou konfigurací.<sup>7</sup> Aminokyseliny, ze kterých se skládají peptidy a bílkoviny, se proto v organismech vyskytují v L-formě. Naopak pro sacharidy, které jsou složkou nukleových kyselin, jsou typické D-izomery.<sup>1</sup> Přírodní výskyt jiných enantiomerů (D-aminokyselin nebo L-sacharidů) je vzácný nebo je výsledkem neobvyklých transformací. Proto se předpokládá, že biologické procesy produkují opticky čisté látky, zatímco syntetické chemické procesy obecně produkují racemáty.<sup>7</sup>

Enantiomery, buď přírodní, nebo uměle připravené, mají často zcela odlišnou chuť a vůni.<sup>1</sup> Čichové vnímání je způsobeno interakcí aromatické molekuly s čichovým receptorem, který je pravděpodobně tvořen proteiny. Proteiny jsou chirální látky, a proto mohou tyto receptory rozdílně interagovat s dvěma enantiomery.<sup>8</sup> Například většina hydrofóbních L-aminokyselin je hořkých, zatímco příslušné D-formy mají velmi sladkou chuť. Monoterpen S-(+)-karvon voní jako kmín, ale R(-)-karvon voní po mátě. Optické izomery se však také liší ve své biologické aktivitě a toxicitě. Vitamín C je aktivní pouze ve své S-formě, R-analog kyseliny askorbové je zcela neaktivní. Léčivo S-propranolol je  $\beta$ -blokátor a R-izomer je neúčinný, R-sotalol je antiarytmikum, zatímco S-sotalol je  $\beta$ -blokátor, R-penicilamin je antiarytmikum a S-penicilamin je extrémně toxický.<sup>1</sup> S-ketoprofen má protizánětlivé účinky, R-enantiomer se užívá při onemocnění ozubice a může být prodáván jako přísada do zubní pasty.<sup>7</sup> Nechvalně známý důsledek aplikace racemátu thalidomidu v 60. letech minulého století měl také souvislost se stereochemií<sup>9</sup>; R-thalidomid má sedativní účinky, avšak S-forma thalidomidu je vysoce teratogenní.<sup>1</sup> Navíc při podání R-thalidomidu dochází k racemizaci *in vivo* a vzniká enantiomer s teratogenními účinky.<sup>10</sup>

Tyto rozdílné biologické a fyziologické vlastnosti jsou způsobeny stereoselektivními interakcemi mezi jednotlivými stereoizomery a bílkovinnými receptory. Rozlišování enantiomerů má za následek rozdílnou biologickou a terapeutickou aktivitu dané látky.<sup>1</sup>

Regulační orgány, jako např. US FDA, nezakazují používání racemických chirálních léčiv, ale požadují veškeré informace o aktivitě a toxicitě obou enantiomerů i racemátu. Obdobná politika je schválena Evropskou komisí pro vlastnictví medicijních produktů (European Commission's Committee on Proprietary Medicinal Products).<sup>7</sup>

## 4. VÝZNAM ENANTIOMERŮ V POTRAVINÁCH

Chiralita byla poprvé pozorována L. Pasteurem, který si všiml krystalků kyseliny vinné vytvořených kolem hrdla láhve od vína. Tyto krystalky se lišily od těch, které se objevily na dně lahve. Obě formy byly později identifikovány jako látky, které jsou si navzájem zrcadlovými obrazy.<sup>7</sup>

Otázka chiralit v potravinách je velice zajímavá. Potravinové složky obsahují přírodní sloučeniny, a proto se v zásadě očekává, že se jedná o enantiomery. Detekce přítomnosti jiných enantiomerů proto může mít velký význam pro stanovení kvality daného produktu. Např. proteiny mohou racemizovat následkem nevhodného technologického zpracování, jako je nadměrný ohřev, ozáření nebo úprava za extrémních hodnot pH. Eventuelně mohou být do produktu přidány umělé racemické přísady, čímž dochází k jeho znehodnocení. Častěji, než je očekáváno, se však potravinové složky (např. ochucovadla) vyskytují ve specifickém poměru enantiomerů. V několika minulých letech proto vzrostl zájem o prověřování enantiomerní čistoty složek potravin. Napomohl tomu i fakt, že enantiomery mohou mít rozdílné výživové hodnoty, chuť, vůni a zejména biologickou aktivitu.<sup>7</sup>

### 4.1 D-Aminokyseliny

#### 4.1.1 D-aminokyseliny: ukazatele podmínek zpracování

D-aminokyseliny jsou obsaženy v potravinách a nápojích vystavených vysokoteplotní úpravě, fermentačním procesům<sup>11</sup> a extrémním pH.<sup>12</sup> Všechny aminokyseliny obsažené v peptidech a proteinech racemizují současně, avšak rozdílnou rychlostí, což je způsobeno odlišnými vlastnostmi aminokyselin, teplotou, pH, fyzikálními podmínkami a dalšími faktory.<sup>11</sup> Zpracování proteinů v sobě může zahrnovat žádoucí změny v chuti, struktuře a rozpustnosti proteinu, stejně tak však mohou být vyvolány i změny nežádoucí, jako je zesílení, hnědnutí a racemizační procesy. Faktory, které ovlivňují racemizaci aminokyselin v proteinech během jejich zpracování, byly dlouho studovány.<sup>13</sup> Byl prováděn výzkum na mléčných aminokyselinách a proteinech s cílem určit, zda-li je racemizace vyvolána během obvykle používaných průmyslových procesů, jako je pasterizace a zpracování za ultravysokých teplot. Výsledky ukázaly, že tepelné zpracování za poměrně vysokých

teplot, avšak krátkého trvání, nevyvolalo racemizaci.<sup>7</sup> Podle další studie vyvolal racemizaci aminokyselin v sušeném mléce pro děti (Sunaru) mikrovlnný ohřev a došlo k vytvoření zejména D-prolinu a *cis*-D-hydroxyprolinu.<sup>14</sup> D-prolin byl autory studie navíc prohlášen jako toxický pro kuřata.<sup>15</sup> Následně byla provedena další rozsáhlá studie, která srovnala racemizaci volných aminokyselin a aminokyselin vázaných v proteinech ve vzorcích Sunaru. Vzorky byly ohřívány v domácích mikrovlnných troubách za regulovaných teplot a po přiměřenou dobu. Za těchto podmínek nedošlo k racemizaci volných ani vázaných aminokyselin<sup>7</sup> v protikladu k výsledkům z předešlé studie.<sup>14</sup>

Jiné otázky se naskýtají v případě vysokoteplotních procesů, jako je pražení kávových a kakaových bobů. Stupeň pražení je hlavním kritériem v hodnocení kvality kávy. Stupeň pražení je obvykle popsán hodnotou organického úbytku při pražení, která je měřena jako hmotnostní úbytek. Z důvodu obtížnosti měření této hodnoty se stupeň pražení obvykle měří jako úbytek či nárůst jednotlivých složek.<sup>7</sup> Vzájemný vztah mezi stupněm pražení, parametry procesu a racemizací aminokyselin byl navržen s pomocí matematické funkce.<sup>16</sup> Tak lze zjistit hodnotu organického úbytku při pražení z poměru D/L a množství aminokyselin. Tato metoda může být použita také u jiných procesů a potravinových produktů, např. u kakaového prášku nebo pečených výrobků. Stupeň racemizace tak může být významným ukazatelem podmínek zpracování a je užitečný při stanovování kvality potravin.<sup>7</sup>

#### 4.1.2 D-aminokyseliny v nekvašených a kvašených potravinách

Mikroorganismy známých kmenů jsou používány při výrobě mléčných výrobků, piva, vína, pečiva a dalších potravin a nápojů.<sup>11</sup> Selektivní mikroorganismy svou činností zlepšují chuť, aroma, strukturu, výživovou hodnotu a skladovatelnost potravin.<sup>17</sup>

Všechny bakterie produkující mléčnou kyselinu obsahují ve své buněčné stěně D-alanin, D-glutamovou kyselinu a D-asparagovou kyselinu, zatímco jiné bakterie obsahují pouze D-alanin a D-glutamovou kyselinu. D-aminokyseliny jsou v bakteriích tvořeny z L-analogů za katalýzy racemáz a epimeráz.<sup>7</sup> Syrové mléko je většinou kontaminováno mikroorganismy přítomnými v bacheru, zejména anaerobními bakteriemi rodu *Bacteroides*, *Ruminococcus* a *Butyrivibrio*.<sup>18</sup> Nízké, avšak významné hladiny D-aminokyselin nalezených v mléce jsou výsledkem trávení a autolýzy bacherových bakterií. Optická čistota D-aminokyselin byla sledována ve vzorcích

mléka skladovaných několik týdnů při teplotě 4°C. D-alanin byl jedinou volnou aminokyselinou, u které proběhly znatelné změny v enantiomerním poměru D/L. Patrně šlo o důsledek činnosti psychrotrofních bakterií. Přítomnost D-alaninu v množství větším než 4% proto může fungovat jako indikátor kontaminace mléka a je používán pro sledování trvanlivosti produktu. Hladina D-alaninu v sušeném mléce bývá někdy vyšší než 4% (13-16%), což signalizuje přítomnost bohaté mikroflory uvolňující alanin racemázu. Racemáza má maximální aktivitu při teplotě 65°C a během technologického procesu produkuje D-alanin. D-aminokyseliny by neměly být přítomné v nekvašených, nijak nezpracovaných potravinách. Racemizace aminokyselin je obecně ukazatelem příměsí a znehodnocení potravin. Přítomnost pouze D-alaninu, D-glutamové kyseliny a D-asparagové kyseliny znamená mikrobiální kontaminaci.<sup>7</sup>

Ovoce neobsahuje D-aminokyseliny, proto by je neměly obsahovat ani ovocné džusy. Při prověřování komerčně dostupných ovocných džusů však bylo v několika vzorcích (grapefruitový a hruškový džus) zjištěno významné množství D-alaninu (8-31 ppm). Přítomnost D-alaninu nemůže být v žádném případě způsobena příměsí, proto se jednalo spíše o výsledek bakteriální kontaminace a horší kvality ovoce použitého k výrobě džusu.<sup>7</sup>

Významné hladiny D-aminokyselin byly také detekovány v medech rozdílného bylinného a geografického původu.<sup>7</sup> Med je přírodní produkt obsahující kromě aminokyselin také uhlovodíky, sacharidy, alkoholy a vitamíny.<sup>11</sup> Určení poměru enantiomerů vybraných aminokyselin zde může být použito při zjišťování doby skladování a podmínek zpracování, za kterých byl med vyráběn.<sup>7</sup> Analýza aminokyselin však také může poskytnout informace o bylinném a zeměpisném původu medu.<sup>19-22</sup> Nejvýznamnější aminokyselina v medu je prolin, její obsah činí 50 až 80% z celkového množství volných aminokyselin.<sup>11</sup>

Enantioselektivní analýza aminokyselin je novým prostředkem pro hodnocení kvality nekvašených potravinových výrobků, jakými jsou ovocné džusy, mléčné produkty a med.<sup>7</sup>

Přítomnost D-aminokyselin ve kvašených potravinách je přirozená. V sýru, jogurtu, víně, octu atd. jsou velmi rozšířené D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina. Zvláště jsou tyto aminokyseliny přítomné ve značném množství ve zralých sýrech a jejich množství roste během doby zrání. Tyto sýry jsou vyráběny ze syrového mléka, do kterého je přidáno syřidlo a bakteriální kultury. Během procesu



zrání se buněčné stěny bakterií rozkládají, uvolňují se racemázy a epimerázy a jejich vlivem dochází k racemizaci volných aminokyselin.<sup>7</sup>

V jogurtu se rovněž vyskytují D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina. Množství těchto enantiomerů je v korelaci s bakteriálním nárůstem *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*. Zvláště obsah D-alaninu, který je produkován pouze bakterií *L. bulgaricus*, přímo souvisí s mikrobiálním množstvím a je používán jako platný rychlý ukazatel pro měření koncentrace *L. bulgaricus* v jogurtu.<sup>7</sup>

#### 4.1.3 Význam D-aminokyselin z hlediska výživy

Kromě buněčné stěny bakterií se D-aminokyseliny také vyskytují v buněčné tekutině některých zástupců hmyzu a mořských bezobratlých<sup>23-27</sup> a jsou přítomné dokonce v tělech některých vyšších rostlin.<sup>28</sup> Hlavní zdroje D-aminokyselin pro člověka zahrnují příjem potravin a nápojů, degradaci buněčných stěn mikroorganismů ve střevě a *de novo* syntézu.<sup>29</sup> Pouze 10-20% přijatých D-aminokyselin je vyloučeno, zbylých 80-90% je absorbováno ve střevech a přeměněno na  $\alpha$ -oxokyseliny oxidázou D-aminokyselin, která je přítomná zejména v játrech, ledvinách a mozku.<sup>30</sup> Toxicita D-aminokyselin pro lidský organismus nebyla dosud jasně prokázána, ačkoliv jejich metabolická dráha není dodnes zcela známá.<sup>13,31</sup> Nahromadění D-aminokyselin v organismu, způsobené nízkou aktivitou oxidázy, může vyvolat řadu vážných poškození, např. inhibici enzymové syntézy nebo potlačení růstu.<sup>32</sup> Metabolismus těchto enantiomerů může být ovlivněn i dalšími faktory, např. rychlostí transportu, činností střevních enzymů a bakterií, absorpcí a ledvinovým oběhem.<sup>7</sup> Při intravenózním podání chemicky čisté racemické směsi aminokyselin dospělým osobám a dětem se neprojeví žádné toxické účinky, přestože podaná dávka obsahovala větší koncentraci aminokyselin, než je množství přijímané v běžné potravě.<sup>18</sup>

## 4.2 Aminokyselina theanin

Při zpracování a výrobě čaje jsou rozlišovány 3 druhy: zelený (nefermentovaný) čaj, oolong (semifermentovaný) čaj a černý (fermentovaný) čaj. Při výrobě čaje se nejedná o typické kvašení způsobené mikroorganismy.<sup>11</sup> Fermentační krok zahrnuje oxidaci dvou a více flavonolů (polyfenolické sloučeniny).<sup>33</sup> Čajové aroma a chuť jsou

tvoreny množstvím těkavých složek a chirálními aminokyselinami. Mezi aminokyselinami běžně se vyskytujícími v čaji má theanin (5-*N*-ethylglutamin) unikátní postavení.<sup>11</sup> Tato aminokyselina se vyskytuje pouze volná, nevázaná v proteinech<sup>34</sup> a je majoritní volnou aminokyselinou v čaji.<sup>11</sup> Theanin zlepšuje kvalitu a charakteristickou chuť zeleného čaje.<sup>35</sup> Každý čistý enantiomer theaninu stejně jako racemická směs mají sladkou chuť.<sup>8</sup> Při analýze několika druhů čaje bylo zjištěno, že celkové množství theaninu a procentuální podíl D-izomeru se mění podle druhu analyzovaného čaje.<sup>36</sup> Vlhkost a vysoké teploty během skladování čaje mohou produkt znehodnotit; dochází ke ztrátám aminokyselin (zejména theaninu), sacharidů a dalších chuťových komponent.<sup>37</sup>

### 4.3 D- a L-mléčná kyselina ve kvašených potravinách

Bakterie *Streptococcus thermophilus* vytváří pouze L-formu kyseliny mléčné, *Lactobacillus bulgaricus* produkuje D-enantiomer. Proto je možné sledovat růst těchto mikroorganismů měřením poměru D/L mléčné kyseliny. Korelace mezi počtem mikroorganismů a poměrem enantiomerů poskytuje spolehlivý a rychlý prostředek při kontrole dodržování pravidel Evropské Unie pro výrobu potravinových produktů.<sup>7</sup>

### 4.4 Chuťové a vonné složky

Za tvorbu aromatických potravinových komponent jsou zodpovědné především mikrobiální reakce, enzymatické reakce a procesy metabolismu rostlin. Chuť a vůně jsou tvořeny komplexní směsí stovek sloučenin, z nichž některé jsou přítomné pouze ve stopových množstvích.<sup>11</sup> V potravinách a nápojích bylo identifikováno množství těkavých látek, jejichž značná část je známá svou chiralitou.<sup>7</sup> Některé tyto složky jsou přirozeného původu, zatímco jiné vznikají během výrobního procesu (fermentace, sušení, pražení, alkalické zpracování atd.).<sup>38</sup> Chirální chuťové a vonné složky v přírodních produktech jsou obecně charakterizovány specifickou distribucí enantiomerů; sloučeniny nejsou vždy přítomné jako čistý enantiomer, ale přesněji ve specifickém enantiomerním poměru.<sup>39</sup> Tento poměr se může lišit podle druhu a stupně zrání.<sup>7</sup> Např. v ovoci mučence se poměr enantiomerů lišil podle zeměpisného původu.<sup>40</sup>

Vyhodnocením specifického enantiomerního rozdělení sloučenin, které nejsou citlivé k racemizaci, mohou být rozlišeny přírodní a umělé složky, obvykle racemické, přidané do potravin.<sup>7</sup>

#### 4.4.1 Laktony

Laktony jsou chuťové složky značně rozšířené v potravinách (ovoci, mléčných výrobcích, nápojích). Důležité jsou zejména  $\delta$ - a  $\gamma$ -laktony.<sup>7</sup>  $\delta$ -Laktony jsou obsaženy především v živočišných produktech (mase, tuku, mléce) a kvašených potravinách.  $\gamma$ -Laktony jsou naopak aromatickými komponentami v ovoci, zelenině a dalších rostlinách.<sup>41</sup> Molekuly těchto laktonů obsahují pět až šest uhlíkových atomů, jsou asymetrické a vyskytují se tedy ve dvou enantiomerních formách.<sup>7</sup> Činností kvasinek mohou být opticky aktivní  $\gamma$ - a  $\delta$ -laktony tvořeny přeměnou 4- a 5-oxokyselin.<sup>42</sup>

Tyto sloučeniny vznikají v ovoci a dalších přírodních zdrojích během enzymatických reakcí a jsou přítomny v charakteristickém enantiomerním poměru.<sup>43</sup> Během zrání se však může měnit enzymová aktivita, metabolismus, a tedy i optická čistota chirálních komponent. Tyto změny pak vedou k úpravě chuti, vůně a struktury ovoce a zeleniny.<sup>11</sup> Specifické a charakteristické enantiomerní poměry laktonů byly nalezeny v meruňkách, broskvích, malinách, jahodách, švestkách, mangu, rynglích, mučence a ovocných džusech, vínech a lihovinách. Obecně byly  $\gamma$ -laktony detekovány ve vysoce opticky čisté R-konfiguraci. R- $\gamma$ -dekalakton a R- $\gamma$ -dodekalakton jsou převládající složkou v jahodách.<sup>44</sup> Významný nadbytek R- $\gamma$ -dekalaktonu byl také nalezen v malinovém džusu.<sup>45</sup> Opticky čisté  $\gamma$ -laktony mají sladkou bylinnou chuť o různé intenzitě.<sup>7</sup> Obecně je R-forma laktonů aromatictější než S-forma.<sup>46</sup> V kokosovém ořechu byla rovněž zjištěna převládající R-forma  $\delta$ -oktalaktonu a  $\delta$ -dekalaktonu. Naproti tomu v malinách převládají S- $\delta$ -laktony.<sup>47</sup> V meruňkách převažují  $\gamma$ -laktony se sudým počtem uhlíkových atomů.<sup>48</sup> Množství R- $\delta$ -laktonů v kokosovém ořechu klesá s rostoucí délkou uhlíkového řetězce v molekule.<sup>7</sup> Mléčné produkty se naopak vyznačují opačným trendem, proto R/S poměr  $\delta$ -laktonů v mléce je používán jako parametr při určování původu tuků.<sup>49</sup> Specifické enantiomerní poměry  $\gamma$ - a  $\delta$ -laktonů nejsou ovlivněny teplotními procesy.<sup>47</sup> Stanovení specifického enantiomerního poměru laktonů v různých přírodních zdrojích umožňuje detekovat přídavek syntetických přísad s pomocí enantioselektivní analýzy.<sup>7</sup>

#### 4.4.2 Karboxylové kyseliny a estery s rozvětveným řetězcem

Rozvětvené karboxylové kyseliny a jejich estery jsou známé přírodní aromatické sloučeniny přítomné v ovoci a sýrech.<sup>44</sup> Zejména 2-methylbutanová kyselina a její methyl- a ethylester byly nalezeny v opticky čisté S-formě v jablku, kterému propůjčují příjemně sladké ovocné aroma. Rovněž všechny jablečné produkty obsahují opticky čistou S-2-methylbutanovou kyselinu, proto přídavek umělé racemické sloučeniny je snadno rozpoznatelný. R-enantiomer této kyseliny má pronikavý sýrově-nasládlý zápach.<sup>7</sup> 3-Methylpentanová, 4-methyloktanová, 4-ethylloktanová a 4-methylnonanová kyselina byly detekovány v sýru. Ve všech případech měly S-enantiomery dvojnásobně nižší práh zápachu než R-enantiomery.<sup>50</sup> Kyselina jablečná se v přírodě vyskytuje pouze ve své S-formě. Příměs racemické kyseliny jablečné v různých ovocných džusech je proto snadno detekována.<sup>11</sup> Podle potravinového nařízení mohou ovocné nápoje obsahovat syntetickou příměs, zatímco ovocné džusy musí být ryze přírodní.<sup>51</sup>

#### 4.4.3 Ketony, alkoholy a ethery

Mnohé ketony, alkoholy a ethery jsou chirální aromatické sloučeniny běžně přítomné v potravinách. Karvon se vyskytuje v rozdílném enantiomerním složení v mátě, kopru, kmínu, pomerančích a grapefruitech. Naopak (+)-fenchon je zodpovědný za typickou vůni fenyklového oleje.<sup>7</sup> (E)- $\alpha$ -Ionen je obsažen jako čistý R-enantiomer v malinách a dalších přírodních zdrojích a může být využíván jako ukazatel rylosti přírodního produktu.<sup>47</sup> Enantioselektivní vyhodnocení se používá jako velmi úspěšná metoda zjišťování kvality rozmarýnového oleje,<sup>52</sup> 1-S-borneol je spolehlivým indikátorem přírodního rozmarýnového oleje. Vyšší obsahy R-1-okten-3-olu, S-pentan-2-olu a S-heptan-2-olu byly nalezeny v houbách a ovoci.<sup>7</sup> Zvláště R-1-okten-3-ol má intenzivní houbovitý zápach<sup>53</sup>, tento enantiomer se vyskytuje v mnoha jedlých druzích hub, např. v *Psalliota campestris* a *Psalliota bispora*.<sup>54</sup> S-analog je méně aromatický.<sup>53</sup> 1-Okten-3-ol vzniká v máslovém oleji jako produkt autooxidace linolové kyseliny (majoritní mastná kyselina).<sup>55</sup> Zvýšení množství tohoto izomeru během skladování je tedy důkazem degradace oleje.<sup>56</sup> Opticky čistý S-heptan-2-ol byl detekován v ovoci a listech černého rybízu.<sup>57</sup> Naopak v kukuřici a kokosovém ořechu je přítomna převážně R-forma heptan-2-olu.<sup>58</sup> Výsledky studie zabývající se přítomností R- a S-butan-2-olu v destilátech ukázaly, že v těchto nápojích jasně převládá R-enantiomer.<sup>59</sup> Ten je v alkoholických nápojích pravděpodobně tvořen

činností bakterií v zápaře, neboť kvasinky produkují pouze S-butan-2-ol. Přítomnost R-enantiomeru je proto obecně považována za důsledek bakteriálního znečištění zápary nebo vína používaných k destilaci.<sup>7</sup> Menthol, chirální monoterpenický alkohol, je významnou složkou mnoha komerčně vyráběných produktů, jako je např. mentholový olej a další esenciální oleje, tabák, kosmetika, farmaceutické výrobky, alkoholické a nealkoholické nápoje a jiné potraviny.<sup>55</sup> Tento alkohol má osm stereoizomerů, avšak známé mentholové aroma má pouze 1R,3R,4S-izomer.<sup>60</sup>

Chirální alkoholy jsou významné z hlediska kontroly kvality potravin. Např. linalool je důležitou chuťovou složkou vyskytující se v proměnlivém enantiomerním složení v koriandru a dalších esenciálních olejích.<sup>61</sup> V olejích ze sicilských a španělských sladkých pomerančů je hlavní složkou S-linalool, zatímco v olejích z hořkých pomerančů převládá R-forma.<sup>7</sup> Stanovení poměru enantiomerů proto umožňuje detekovat znehodnocení olejů z hořkých pomerančů příměsí levnějšího oleje ze sladkých pomerančů.<sup>62</sup> Za kyselých podmínek však linalool podléhá racemizaci, a proto musí být tento fakt brán na zřetel při stanovování enantiomerního poměru například v ovocných džusech a vínech.<sup>7</sup>

Theaspirany (chirální spiroethery) byly nalezeny jako směs diastereomerů v černém čaji, vanilce, angreštu a malinách různého zeměpisného původu.<sup>7</sup>

#### 4.4.4 Terpenoidy

Monoterpeny a seskviterpeny jsou primární produkty rostlin. Tyto těkavé látky jsou významnými komponentami rostlinných silic (etherických olejů).<sup>63</sup> Příkladem chirálních terpenoidů je limonen,  $\alpha$ -pinen a  $\beta$ -pinen.<sup>11</sup> Limonen je obsažen v citronové, pomerančové, mandarinkové, grapefruitové, kmínové a koprové silici.<sup>60</sup> Limonen byl také identifikován jako metabolit plísňovitých hub.<sup>63</sup> S-enantiomer voní po citronech, zatímco R-limonen má pomerančové aroma.  $\alpha$ -Pinen a  $\beta$ -pinen jsou přítomny v mnoha rostlinných silicích a mají typickou terpentýnovou vůni.<sup>11</sup>

#### 4.4.5 Sloučeniny obsahující síru

Mučenka je tropické ovoce, za jehož unikátní chuť jsou zodpovědné sloučeniny, obsahující ve své struktuře síru.<sup>7</sup> Směs *cis*- a *trans*-2-methyl-4-propyl-1,3-oxathianu dodává ovoci silné přírodně ovocné aroma.<sup>40</sup> Další sloučeninou je 3-merkaptohexanol, který je přítomný zejména jako S-enantiomer, ačkoliv jeho optická čistota se mění

v širokém rozmezí. Naopak 3-methylthiohexanol je přítomen v mučence ve vysoce čisté S-formě, a proto je vhodným kritériem pro hodnocení kvality produktu.<sup>64</sup>

#### 4.4.6 Kyselina glutamová

Volná kyselina glutamová se přirozeně vyskytuje ve větším množství v bramborách, rajčatech, hrášku a jedlých houbách. Její sodná sůl (MSG) se běžně používá jako potravinové aditivum zlepšující chuť.<sup>11</sup> Pro tento účel má však význam pouze L-enantiomer MSG.<sup>65</sup>

### 4.5 Vitamíny

Vitamíny patří do rozsáhlé skupiny látek, které obecně obsahují jedno nebo více chirálních center. Vitamíny se vyskytují přirozeně v živých organismech, ale mohou být také používány jako potravinová aditiva. Mnoho těchto látek je významnými průmyslovými sloučeninami. Zhodnocením stereochemického složení vitamínů mohou být získány informace o jejich účinnosti, stáří, původu, skladovacích podmínkách ad.<sup>11</sup> Tabulka 1 ukazuje biologické funkce významných chirálních vitamínů a enantiomer, je-li znám, zodpovědný za jejich aktivitu.

Tabulka 1: Přehled vybraných chirálních vitamínů (dle citací 2, 8)

Vitamín	Název	Počet chirál. center	Biologická funkce	Aktivní izomer
A	retinol	1	součást zrakového pigmentu rhodopsinu, důležitý pro funkci epitelových tkání	
Bc / M	listová kyselina	1	snižuje výskyt vrozených vad, ochrana proti srdečním chorobám	
	folinová kyselina	2	protinádorová léčba	S-izomer
B <sub>5</sub>	pantothenová kyselina	1	součástí koenzymu A	S-izomer
C	askorbová kyselina	2	neenzymový přenašeč vodíku, potřebný pro syntézu vaziva a odolnost organismu	S-izomer
D <sub>2</sub>	ergokalciferol	6	vliv na vstřebávání a metabolismus vápníku a fosforečnanů, nezbytné pro správný vývoj a růst kostí a zubů	
D <sub>3</sub>	kolekalciferol	3		
H	biotin	3	tvoří koenzym karboxyláz, nutný pro správnou funkci kůže	(+)-β-biotin
E	tokoferol	3	významný přírodní antioxidant	R-α-tokoferol
K	fylochinon	2	nezbytný pro srážlivost krve	R-izomer
L	2-aminobenzoová kyselina	4	laktační faktor	
U	methylmethionin	1	prevence komplikací v těhotenství a při porodu	S-izomer

## 5. ANALYTICKÉ METODY SEPARACE ENANTIOMERŮ

V minulosti byla optická čistota látky stanovována měřením její optické aktivity v polarimetru. Později byla prováděna separace enantiomerů pomocí chromatografických metod<sup>7</sup> a následně také elektroforetických metod.<sup>66</sup> Po první separaci provedené Pasteurem se začala využívat plynová chromatografie (GC)<sup>67</sup> a později vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)<sup>68</sup> a chromatografie na tenké vrstvě (TLC)<sup>69</sup>. Během několika posledních let se objevilo obrovské množství výzkumných prací vedoucích k vývoji nových metod založených na nových principech. Někdy jsou používány také enzymatické metody, které jsou závislé na stereoselektivitě enzymů.<sup>70</sup> Nedávno se také začaly uplatňovat enzymy imobilizované na membránách, které produkují biosenzory.<sup>71</sup>

Jednou z nejdůležitějších oblastí využívajících enantioseparaci je analýza léčiv. Rozdílné interakce enantiomerních léčiv během procesu absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování mají vliv na odlišné terapeutické, avšak i toxické účinky.<sup>1</sup>

Další aplikační oblastí stereoselektivní analýzy je výzkum v environmentálních vědách, zejména analýza agrochemikálií a polutantů s ohledem na jejich enantioselektivní metabolický rozklad.<sup>72-74</sup> K ochraně biologických a ekologických systémů před nadměrným množstvím neúčinných agrochemikálií může přispět i používání pouze aktivních enantiomerů pesticidních látek.<sup>1</sup>

Třetí oblastí, ve které má separace enantiomerů hojné uplatnění, je kontrola potravin. Většina složek potravin jsou chirální sloučeniny.<sup>1</sup> Ještě donedávna nebyla stereochemie látek obsažených v potravinách brána v úvahu, přestože enantiomerní poměr neovlivňuje pouze vůni a chuť, ale i výživové hodnoty.<sup>75</sup> Enantioselektivní analýza může být využita při kontrole technologického zpracování, identifikaci příměsí, kontrole fermentačních procesů, stáří, zhodnocování mikrobiální kontaminace a skladovacích podmínek, určování zeměpisného původu a při studiu a kontrole příchutí a aditiv v potravinách a nápojích.<sup>1,7</sup>



## 5.1 Základní principy chirální separace

Techniky separace enantiomerů jsou založeny na principech chirálního rozpoznávání pozorovaného v přírodě. Zde platí jednoduchý zákon: „Separace enantiomerů je možná pouze v chirálním prostředí.“ V nepřítomnosti jiné opticky aktivní sloučeniny mají enantiomery totožné chemické vlastnosti a za této podmínky tedy nemohou být rozděleny.<sup>1</sup>

Při separaci enantiomerů jsou využívány dva základní postupy: přímé separační metody a nepřímé separační metody.<sup>1,7</sup>

### 5.1.1 Nepřímé separační metody

Nepřímé metody jsou založeny na derivatizační reakci racemického analytu s opticky čistým činidlem. Při této reakci vzniká pár diastereomerních sloučenin, které mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti. K následné separaci pak může být použita jakákoliv achirální technika. (Plynová chromatografie nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie využívající běžné achirální kolony.)<sup>7</sup> K výhodám nepřímé separace patří vysoká účinnost a rozlišovací schopnost achirálních stacionárních fází, snadná změna pořadí eluce enantiomerů při použití derivatizačního činidla o opačné prostorové konfiguraci a zlepšení detekční schopnosti vhodným derivatizačním činidlem. Nepřímé metody separace však mají i řadu nevýhod. Mohou být obtížné, časově náročné a použité derivatizační činidlo musí mít vysokou optickou čistotu. Při dodatečných operacích hrozí riziko ztrát, postranních reakcí a racemizace během derivatizace. Enantiomery nemusí mít stejné hodnoty rychlostních konstant derivatizačních reakcí. Přímá kvantifikace a určení enantiomerních poměrů z ploch píků nemusí být zcela přesné, neboť molární absorpční koeficienty diastereomerů mohou být odlišné. Z těchto důvodů jsou v současné době nepřímé separační metody častěji nahrazovány vhodnějšími metodami přímými.<sup>1</sup>

### 5.1.2 Přímé separační metody

Zavedením vhodného opticky aktivního selektoru do separačního systému je dosaženo přímé separace optických izomerů. Chirální selektory mohou být navázány na pevnou matici nebo stěnu kapiláry. V kapalinové chromatografii nebo elektromigračních metodách může být také chirální selektor přidán do mobilní fáze

nebo základního elektrolytu. Pro separaci enantiomerů se jako chirálních selektorů využívá řada opticky aktivních látek, jako jsou aminokyseliny, peptidy, polysacharidy aj. Velice rozšířenou skupinou selektorů používaných pro chirální separace jsou cyklodextriny a jejich deriváty. Přímá separace optických izomerů má několik výhod. Vzorek nevyžaduje specifickou předběžnou úpravu, separace je rychlá a nenáročná. Enantiomerní poměr určený z ploch píků je přesný a metoda umožňuje izolovat čisté enantiomery. Během separačního procesu však může dojít k racemizaci, což je nevýhoda přímých metod.<sup>1</sup>

## 5.2 Metody používané pro separaci enantiomerů

### 5.2.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou metody založené na rozdělování látek mezi dvě fáze. Jednotlivé složky vzorku jsou děleny na základě ustavování sorpčních, rozpouštěcích nebo iontově výměnných rovnováh mezi dvěma nemísitelnými fázemi. Základem separačního chromatografického procesu je opakované ustavování rozdělovací rovnováhy vzorku mezi mobilní a stacionární fází. Vzorek je unášen mobilní fází a při průchodu chromatografickou kolonou opakovaně interaguje se stacionární fází. Jednotlivé složky vzorku jsou touto interakcí selektivně bržděny. Velikost brždění je úměrná vazebné síle této interakce. Chromatografické metody je možné rozdělit podle skupenství použité mobilní fáze. Pokud je tato fáze plynná, jedná se o plynovou chromatografii (GC), v kapalinové chromatografii (LC) se používá kapalná mobilní fáze. Speciálním případem je superkritická fluidní chromatografie (SFC), ve které se používá jako mobilní fáze pára při nadkritické teplotě a tlaku.<sup>76</sup>

#### 5.2.1.1 Plynová chromatografie

Metoda plynové chromatografie (GC) se využívá pro analýzu těkavých látek, které mohou být převedeny do plynného stavu. Zvláštním problémem této metody je analýza málo těkavých složek, které je nutno předem převést na těkavé látky derivatizací.<sup>76</sup>

V plynové chromatografii se využívá jak metoda nepřímé separace enantiomerů, tak přímá enantioseparace na chirálních stacionárních fázích rozdílného složení.<sup>1</sup>

Chirální stacionární fáze (CSP) používané v plynové chromatografii se rámcově dělí do tří nejběžněji využívaných skupin:<sup>1,5</sup>

1. CSP tvořené deriváty aminokyselin nebo peptidů (např. Chirasil-Val).<sup>1,7</sup> Tato skupina CSP se používá k rozdělení enantiomerních derivátů aminokyselin, hydroxykyselin, aminů, aminoalkoholů.<sup>7</sup>
2. CSP obsahující chirální komplexy kovových iontů, které vytváří diastereomerní ternární komplexy.<sup>7</sup> Při vytváření komplexů dochází k enantioselektivním interakcím.<sup>1</sup> Tyto CSP se využívají k separaci epoxidů, tetrahydrofuranů, ethylensulfidů, nemodifikovaných alkoholů a ketonů.<sup>7</sup>
3. CSP tvořené deriváty cyklodextrinů, které umožňují tvorbu inkluzních komplexů s analyty, případně umožňují interakce enantiomerů na vnějším povrchu. CSP jsou schopné separovat terpeny, laktony, alkoholy, ethery atd.<sup>7</sup>

### 5.2.1.2 Kapalinová chromatografie

V kapalinové chromatografii (LC) je přímého rozdělení enantiomerů dosaženo použitím chirální stacionární fáze nebo chirálního selektoru přidaného do mobilní fáze protékající achirální stacionární fází.<sup>1</sup> Chirální stacionární fáze v kapalinové chromatografii se dělí podle převládajícího typu interakce zodpovědné za chirální separaci<sup>77</sup>:  $\pi$ - $\pi$  interakce (obvykle doprovázené vodíkovou vazbou), ligandová výměna, inkluze, kombinace přitažlivých interakcí s inkluzí, kombinace hydrofóbních a polárních interakcí.<sup>1</sup>

Pro chirální separace je nejvyužívanější technikou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Separační kolony jsou naplněny homogenní stacionární fází tvořené částicemi malého průměru. Pro dostatečný průtok mobilní fáze je nutné použít přetlak řádově jednotek až desítek MPa. HPLC se využívá k analýze směsí netěkavých látek často ve složitých maticích.<sup>76</sup> Chirální stacionární fáze používané v HPLC je možno zhruba rozdělit do několika základních skupin:

1. CSP, na nichž dochází k chirální separaci na základě  $\pi$ - $\pi$  donor-akceptorových interakcí a utváření vodíkových vazeb. Tyto CSP se používají k separaci enantiomerů aromatických sloučenin.<sup>7</sup>
2. CSP tvořené cyklodextriny, případně dalšími chirálními selektory umožňujícími inkluzi (cyklické ethery) převážně inkluzním mechanismem a dalšími interakcemi.<sup>7</sup>

3. CSP tvořené deriváty sacharidů. Separace probíhá na základě rozdílných inkluzí enantiomerů do jejich helikální struktury. Tato skupina CSP se používá k separaci nitrilů, diesterů, ketonů, sulfoxidů atd.<sup>7</sup>
4. CSP využívající aminokyselin, peptidů a proteinů jako chirálních selektorů. Jsou vhodné především k enantioseparaci analytů podobné struktury, jako mají sami.<sup>1</sup>
5. CSP s makrocyclickými antibiotiky. Separační mechanismus umožňuje využití různých typů interakcí, a proto mají tyto CSP velmi široké použití pro mnoho strukturně značně odlišných látek.<sup>1</sup>

Kromě chirální stacionární fáze se k přímému rozdělení enantiomerů dále využívá chirální selektor přidaný do mobilní fáze.<sup>1,7</sup> Výhodou tohoto postupu je použití levnější běžné achirální stacionární fáze, široký výběr chirálních selektorů, snadná výměna chirálního selektoru a snazší změna pořadí eluce enantiomerů použitím chirálního selektoru o opačné konfiguraci.<sup>1</sup> Nejběžněji používanými aditivami jsou chirální komplexy dvojmocné mědi s enantiomery aminokyselin. K rozdělení izomerů dochází na základě vytvoření ternárních diastereomerních komplexů rozdílné stability. Metoda může být použita k separaci některých aminokyselin, hydroxykyselin a dipeptidů.<sup>7</sup>

Další technikou kapalinové chromatografie využívanou pro stereochemickou analýzu je chromatografie na tenké vrstvě (TLC)<sup>69</sup>. U této metody je stacionární fáze tvořena tenkou vrstvou sorbentu. Výhodami TLC jsou jednoduchost provedení a nízká ekonomická nákladnost.<sup>76</sup>

## 5.2.2 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou metody založené na separaci látek vlivem elektrického pole. Částice, které mají odlišný rozměr a velikost náboje, se v elektrickém poli pohybují (migrují) rozdílnou rychlostí, a proto je lze od sebe oddělit. Nejvýznamnější technikou je kapilární elektroforéza.<sup>76</sup> Dalšími metodami separace enantiomerů mohou být izotachoforéza a kapilární elektrochromatografie.<sup>1</sup>

### 5.2.2.1 Kapilární zónová elektroforéza

Hlavními výhodami kapilární zónové elektroforézy (CZE) jsou vysoká účinnost, rozlišení a rychlost separace. Nižší citlivost detekce a horší reprodukovatelnost jsou naopak nevýhody. Nepřímé metody separace jsou v CZE využívány pouze zřídka.

Přímé separace je obvykle dosaženo přidávkem chirálních selektorů, které jsou analogické selektorům využívaných v HPLC.<sup>1</sup>

Pro chirální separace lze využít i dalších elektromigračních technik. Pro nenabitě nebo hydrofóbnější analyty je vhodná micelární kapilární elektroforéza (MCE), kde dělení probíhá na základě rozdílné afinity separovaných látek k micelám. Micely mohou být buď přímo chirální, nebo lze chirální selektor přidávat do základního elektrolytu. V takovém případě často dochází k tvorbě tzv. směsných micel, tvořených nechirální povrchově aktivní látkou, do které se zabuduje chirální selektor.<sup>1</sup>

Kapilární elektrochromatografie (CEC) je metoda podobná HPLC s tím rozdílem, že pohyb „mobilní fáze“ – základního elektrolytu není řízen tlakem, ale elektroosmotickým tokem. Chirální stacionární fáze resp. chirální aditiva do mobilní fáze používané v CEC jsou stejné jako pro HPLC.<sup>1</sup>

## 6. ENANTIOSELEKTIVNÍ SEPARACE SLOŽEK POTRAVIN

Vysoká separační účinnost a citlivost enantioselektivních chromatografických a elektromigračních metod umožňuje rozlišení mnoha enantiomerů v přírodních zdrojích a potravinách. Enantiomerní poměr je spolehlivým parametrem při určování kvality potravin, neboť tento poměr je specifický pro každý přírodní zdroj potravin. S pomocí tohoto významného kritéria se mohou odlišit přírodní chuťové složky od syntetických přísad.<sup>7</sup>

Avšak i v enantioselektivní analýze platí několik omezení :

- Chirální sloučeniny se v přírodě mohou vyskytovat v rozdílných enantiomerních poměrech, a proto detekce nežádoucích příměsí nemusí být zcela přesná.<sup>7</sup>
- Částečná nebo úplná racemizace citlivých chirálních složek (sloučenin, u kterých je nízká racemizační energetická bariéra) může být způsobena až laboratorní úpravou před samotnou analýzou nebo podmínkami během skladování či dokonce analýzy. Proto musí být zvažována kinetika racemizace během pracovních podmínek.<sup>7</sup>

Pro stereochemickou analýzu potravin bývá někdy využívána kombinace chromatografických metod s některou další instrumentální metodou vhodnou především pro identifikaci. Tyto techniky se nazývají “hyphenated-techniques”<sup>7,76</sup> a patří k nim zejména kombinace separační techniky (GC, HPLC) s hmotnostní spektrometrií (MS).<sup>7</sup> Rozvoj nových analytických metod, jako jsou senzory a biosenzory pro enantioselektivní analýzu, může poskytnout nové možnosti pro snazší určování kvality potravin.<sup>7</sup> Biosenzory pro stanovení D-alaninu<sup>78</sup> a L-mléčné kyseliny<sup>79</sup> již byly navrženy.

### 6.1 Příklady analýzy vybraných chirálních složek potravin

#### 6.1.1 Aminokyseliny

Pro rozlišení nativních nederivatizovaných enantiomerů aminokyselin byly v HPLC využity metody ligandové výměny<sup>80</sup>, CSP tvořené cyklickými ethery<sup>81</sup>, CSP tvořené makrocyclickými antibiotiky (vankomycin, rifamycin B, thiostrepton, teikoplanin, ristocetin A)<sup>82</sup> nebo  $\alpha$ -cyklodextrinová CSP pro separaci aromatických

aminokyselin<sup>83</sup>. Derivatizací aminokyselin achirálním činidlem může být dosaženo vyšší citlivosti a selektivity metody. Používanými činidly jsou např. dansyl chlorid (DNS-Cl), dinitrobenzoyl chlorid (DNB-Cl) a jeho deriváty<sup>84</sup>, *N*-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl), *N*-fluorenylmethoxykarbonyl-*L*-glycyl chlorid (FMOC-Gly-Cl) a 6-amino-quinolyl-*N*-hydroxysukcinimidylkarbamát (AQC)<sup>36</sup>. Tato derivatizační činidla jsou úspěšně využívána pro mnoho chirálních separací, derivatizované kyseliny jsou navíc často snáze separovatelné.<sup>11</sup>

Alternativní možností je separace chromatografií na tenké vrstvě. Pro dělení aminokyselin byly využity jako aditiva mobilní fáze cyklodextriny a jejich deriváty<sup>85</sup> nebo makrocyclická antibiotika – vankomycin<sup>86</sup>. Dělení enantiomerů aminokyselin bylo uskutečněno v TLC i na CSP.<sup>87</sup> Toto řešení je však méně běžné.<sup>11</sup>

GC využívá pro analýzu aminokyselin tři typy CSP: deriváty chirálních aminokyselin (Chirasil-Val)<sup>88</sup>, chirální kovové koordinační sloučeniny<sup>89</sup> a deriváty cyklodextrinů.<sup>90</sup> Chirasil-Val je stacionární fáze tvořená polysiloxanovou kostrou s postranními řetězci obsahujícími zbytky *L*-valin-*tert*-butylamidu. Na této CSP se separuje většina proteinogenních aminokyselin.<sup>88</sup> Jelikož nativní aminokyseliny nejsou těkavé, před GC separací musí být nejprve derivatizovány. Nejprve dochází k esterifikaci karboxylové skupiny, a poté k tvorbě amidu reakcí aminové skupiny s derivatizačním činidlem (např. anhydridem kyseliny trifluoroctové).<sup>11</sup>

Metoda kapilární elektroforézy je využívána pro analýzu stopových množství aminokyselin.<sup>91</sup> Výhodou CE je krátký čas separace a vysoká separační účinnost.<sup>8</sup> Nejběžnějšími chirálními selektory využívanými pro analýzu aminokyselin jsou cyklodextriny a jejich deriváty<sup>92</sup>, oligosacharidy<sup>93</sup> a makrocyclická antibiotika (vankomycin)<sup>94</sup>.

### 6.1.2 Sacharidy

Jedním ze způsobů separace sacharidů je nepřímá metoda zahrnující převedení na diastereomery reakcí s chirálním činidlem, kterým mohou být opticky čisté aminokyseliny, chirální thioly, chirální hydroxysloučeniny atd.<sup>95</sup> Diastereomery potom mohou být separovány metodou HPLC nebo GC v achirálním separačním prostředí. Druhým a upřednostňovaným způsobem je přímá separace oběma metodami.<sup>11</sup>

V HPLC jsou nejběžněji používanými CSP pro separaci sacharidů  $\alpha$ - a  $\beta$ -cyklodextriny, které vykazují vysokou stabilitu a účinnost.<sup>96</sup> Během chromatografického procesu může docházet k mutarotaci, což komplikuje separaci

enantiomerů. Regulací rychlosti toku mobilní fáze, separační teploty, složením mobilní fáze a typem stacionární fáze může být vliv mutarotací kontrolován.<sup>11</sup>

Plynová chromatografie využívá mnoho různých typů CSP<sup>89</sup>, jako např. Chirasil-Val<sup>88</sup> nebo deriváty cyklodextrinů. Nejběžnějšími jsou  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -cyklodextriny, z nichž pro analýzu sacharidů mají nejvyšší enantioselektivitu deriváty  $\beta$ -cyklodextrinu.<sup>11</sup>

### 6.1.3 Některé další analyty

Analytické metody separace chirálních  $\gamma$ - a  $\delta$ -laktónů využívají jednak derivatizační reakci s tvorbou diastereomerních esterů<sup>97</sup> a dále přímou separaci metodou GC na modifikovaných cyklodextrinových CSP. Přímé metody separace jsou preferovány.<sup>11</sup>

Při analýze 1-okten-3-olu je nejprve tento alkohol derivatizován např. reakcí s kyselinou  $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylfenyloctovou a vzniklé diastereomery jsou poté separovány metodou GC.<sup>98</sup> Pro separaci alkan-2-olů jsou využívány zejména přímé a méně často také nepřímé metody.<sup>11</sup> Stereoisomery mentholu v mátové silici byly separovány metodou GC na CSP tvořených derivatizovaným  $\beta$ -cyklodextrinem.<sup>99</sup>

3-Hydroxykyseliny mohou být derivatizovány na karbamátamidy<sup>100</sup> nebo 3-pentylestery<sup>101</sup> a poté separovány na CSP. Karboxylové kyseliny a estery byly separovány s pomocí HPLC<sup>102</sup> i GC na CSP s navázaným  $\beta$ -cyklodextrinem.<sup>103</sup> V případě použití metody GC je většinou třeba tyto polární analyty předem derivatizovat z důvodu zvýšení jejich těkavosti. Derivatizaci lze provádět jak achirálním, tak chirálním činidlem.<sup>11</sup>

Některé enantiomery ketonů byly separovány metodou GC na CSP tvořené cyklodextrinem.<sup>104</sup>

Používanou přímou metodou separace terpenoidů je GC s CSP tvořenou cyklodextrinem.<sup>105</sup>  $\alpha$ -Pinen byl separován technikou HPLC s využitím  $\alpha$ -cyklodextrinu jako chirálního selektoru přidaného do mobilní fáze.<sup>106</sup>



## 7. ZÁVĚR

Znalost chiralit přírodních a uměle připravených látek má pro hodnocení kvality potravin nemalý význam. Enantiomerní poměry potravinových komponent neovlivňují pouze aroma výrobku, ale také výživovou hodnotu. Vlivem nevhodného zpracování potravin může docházet k racemizaci jednotlivých složek. Ke změně poměru enantiomerů dochází také např. v důsledku bakteriální kontaminace či přidavkem syntetické příměsi.

Bakalářská práce je řazena do několika kapitol. Úvodní kapitola je věnována základním pojmům, které mají souvislost s optickou izomerií. Následující kapitola se týká rozdílných vlastností a biologických účinků enantiomerů. V další kapitole je rozsáhlý přehled hlavních složek v potravinách se zaměřením na jejich význam při kontrole kvality výrobků. Poslední dvě kapitoly jsou věnovány analýze potravinových složek. V první z nich je vysvětlen princip jednotlivých metod enantioseparace a dále následují již konkrétními příklady analýzy chirálních látek v potravinách.

## SEZNAM LITERATURY

1. Tesařová E., Armstrong D. W., v knize: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in BioSciences* (Deyl Z., ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 1998.
2. Streblová E.: *Souhrnné texty z chemie, II. díl*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2000.
3. Trnka T., Klinotová E., Kotora M., Sejbal J.: *Organická chemie*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
4. Červinka O.: *Chem. Listy* 93, 294 (1999).
5. March J.: *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley and Sons, New York 1992.
6. Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V.: *Angew. Chem.* 5, 385 (1966).
7. Marchelli R., Dossena A., Palla G.: *Trends Food Sci. Technol.* 7, 113 (1996).
8. Pickenhagen W., v knize: *Flavor Chemistry – Trends and Developments* (Teranishi R., Buttery R. G., Shahidi F., eds.). American Chemical Society, Washington, DC 1989.
9. Fassihi A. R.: *Int. J. Pharm.* 92, 1 (1993).
10. Knocke B., Blaschke G.: *J. Chromatogr. A* 666, 235 (1994).
11. Ekborg –Ott K. H., Armstrong D. W., v knize: *Chiral Separations: Applications and Technology* (Ahuja S., ed.), kap. 9. American Chemical Society, Wahington, DC 1997.
12. Palla G., Marchelli R., Dossena A., Casnati G.: *J. Chromatogr. A* 475, 45 (1989).
13. Tovar L. R., Schwass D. E., v knize: *Xenobiotics in Foods and Feeds* (Finley J. W., Schwass D. E., eds.). American Chemical Society, Wahington, DC 1983.
14. Lubec G., Wolf C., Bartosch B.: *Lancet* 334, 1392 (1989).
15. Kampel D., Kupfersmidt R., Lubec G., v knize: *Amino Acids* (Lubec G., Rosenthal G. A., eds.). Escom, Leiden 1990.
16. Nehring U. P.: *Proceedings of the Symposium on Chemical Reactions in Foods* (Velíšek J., ed.). VUPP-STI, Praha 1992.
17. Berger R. G., Drawert F., Hädrich S., v knize: *Bioflavour '87, Analysis – Biochemistry Biotechnology* (Schreier P., ed.). de Gruyter, Berlin 1988.
18. Brückner H., Jaek P., Langer M., Godel H.: *Amino Acids* 2, 271 (1992).
19. Davies A. M.C.: *J. Food Technol.* 11, 515 (1976).

20. Gilliam M., McCaughey W. F., Wintermute B.: *J. Asp. Res.* 19, 64 (1980).
21. Gilbert J., Shepherd M. J., Wallwork M. A., Harris R. G.: *J. Asp. Res.* 19, 125 (1981).
22. Poncini L., Wimmer F. L., Vakamoce V.: *Fiji Agric. J.* 45, 65 (1983).
23. Preston R. L.: *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 55 (1987).
24. Corrigan J. J.: *Science* 164, 142 (1969).
25. D'Aniello A., Giuditta A.: *J. Neurochem.* 31, 1107 (1978).
26. Felbeck H.: *J. Exp. Zool.* 234, 145 (1985).
27. Matsushima O., Katayama H., Yamada K., Kado Y.: *Mar. Biol. Lett.* 5, 217 (1984).
28. Robinson T.: *Life Sci.* 19, 1097 (1976).
29. Zagon J., Dehne L. I., Bögl K. W.: *Nutr. Res.* 14, 445 (1994).
30. D'Aniello A., D'Onofrio G., Pischetola M., D'Aniello G., Vetere A., Petrucelli L., Fisher G. H.: *J. Biol. Chem.* 268, 16949 (1993).
31. Friedman M., v knize: *Formation, Nutritional Value and Safety of D-Amino Acids in Nutritional and Toxicological Consequences of Food Processing* (Friedman M., ed.). Plenum Press, 1991
32. D'Aniello A., Di Fiore M., Fisher G.: *Trends Compar. Biochem. Physiol.* 4, 1 (1998).
33. Roberts E. A. H.: *J. Sci. Food Agric.* 3, 193 (1952).
34. Selvendran R. R.: *Ann. Bot.* 34, 825 (1970).
35. Sakato Y.: *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 23, 262 (1950).
36. Ekborg-Ott K. H., Armstrong D. W., Taylor A. D.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 473 (2002).
37. Stag G. V.: *J. Sci. Food Agric.* 25, 1015 (1974).
38. Stalcup A. M., Ekborg K. H., Gasper M. P., Armstrong D. W.: *J. Agric. Food Chem.* 41, 1684 (1993).
39. Dufossé L., Latrasse A., Spinnler H.: *Sci. Aliment.* 14, 17 (1994).
40. Singer G., Heusinger G., Fröhlich O., Schreier P., Mosandl A.: *J. Agric. Food Chem.* 34, 1029 (1986).
41. Mosandl A., Gessner M.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 187, 40 (1988).
42. Muys G. T., van der Ven B., de Jonge A. P.: *Nature* 194, 995 (1962).
43. Mosandl A., Hener U., Hagenauer-Hener U., Kustermann A.: *J. High. Resolut. Chromatogr.* 12, 532 (1989).

44. Mosandl A.: *Food Rev. Int.* 11, 597 (1995).
45. Werkhoff P., Brennecke S., Bretschneider W.: *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 15, 47 (1993).
46. Mosandl A., Günther C.: *J. Agric. Food Chem.* 37, 413 (1989).
47. Lehmann D., Dietrich A., Schmidt S., Dietrich H., Mosandl A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196, 207 (1993).
48. Guichard E., Kustermann A., Mosandl A.: *J. Chromatogr.* 498, 396 (1990).
49. Nago H., Matsumoto M.: *Bioscience Biotechnol. Biochem.* 57, 427 (1993).
50. Karl V., Gutser J., Dietrich A., Maas B., Mosandl A.: *Chirality* 6, 427 (1994).
51. Goodall D. M., Wu Z., Lisseter S. G.: *Anal. Proc.* 29, 14 (1992).
52. König A. W., Krebber R., Evers P., Bruhn G.: *J. High. Resolut. Chromatogr.* 13, 328 (1990).
53. Gessner M., Deger W., Mosandl A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186, 417 (1988).
54. Maga J. A.: *J. Agric. Food Chem.* 29, 1 (1981).
55. Mosandl A.: *J. Chromatogr.* 624, 267 (1992).
56. Widder S., Sen A., Grosch W.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 193, 32 (1991).
57. Humpf H., Schreier P.: *J. Agric. Food Chem.* 39, 1830 (1991).
58. Engel K. H., v knize: *Bioflavour '87, Analysis – Biochemistry Biotechnology* (Schreier P., ed.). de Gruyter, Berlin 1988.
59. Manitto P., Chialva F., Speranza G., Rinaldo C.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 886 (1994).
60. Mosandl A.: *Food Rev. Int.* 4, 1 (1988).
61. Derbesy M., Uzio R.: *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.* 86, 369 (1993).
62. Dugo G.: *Flavour Fragrance J.* 9, 99 (1994).
63. Tressl R., Apetz M., Arrieta R., Grünwald K. G., v knize: *Flavor of Foods and Beverages* (Charalambous G., Inglett G. E., eds.). Academic, New York 1978.
64. Weber B.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199, 48 (1994).
65. Yoshida T., v knize: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, sv. II. Wiley, New York 1978.
66. Rogan M. M., Altria K. D., Goodall D. M.: *Chirality* 6, 25 (1994).
67. Gil Av E., Feibush B., Charles-Siegler R.: *Tetrahedron Lett.* 1966, 1009 (1966).
68. Rogozhin S. V., Davankov V. A.: *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 490 (1971).

69. Weinstein S.: *Tetrahedron Lett.* 25, 985 (1984).
70. Alm L.: *J. Dairy Sci.* 65, 515 (1982).
71. Campanella L., Favero G., Fortuney A., Sammartino M. P., Tomassetti M.: *Life Chem. Rep.* 11, 363 (1994).
72. Armstrong D. W., Reid G. L., Hilton M. L., Chang C. D.: *Environ. Pollut.* 79, 51 (1993).
73. Šafaříková M., Tesařová E.: *Životné prostredie* 29, 45 (1995).
74. Tombo G. M. R., Belluš D.: *Angew. Chem.* 103, 1219 (1991).
75. Taylor D. R., Maher K.: *J. Chromatogr. Sci.* 30, 67 (1992).
76. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
77. Ahuja S. (ed.): *Chiral Separations by Liquid Chromatography*. American Chemical Society, Washington, DC 1991.
78. Labadini L.: *Proceedings of the Euro Food Chem VIII* (Sontag G., Pfannhauser G., eds.). Institute for Analytical Chemistry, Vienna 1995.
79. Dempsey E., Wang J., Smyth M. R.: *Talanta* 40, 445 (1993).
80. Gübitz G., Juffmann F., Jellenz W.: *Chromatographia* 16, 103 (1982).
81. Hilton M. L., Armstrong D. W.: *J. Liq. Chromatogr.* 14, 9 (1991).
82. Armstrong D. W., Liu Y., Ekborg-Ott K. H.: *Chirality* 7, 474 (1995).
83. Armstrong D. W., Yang X., Han S. M., Menges R. A.: *Anal. Chem.* 59, 2594 (1987).
84. Hilton M. L., Chang S. C., Gasper M. P., Pawlowska M., Armstrong D. W., Stalcup A. M.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 127 (1993).
85. Duncan J. D., Armstrong D. W., Stalcup A. M.: *J. Liq. Chromatogr.* 13, 1091 (1990).
86. Armstrong D. W., Zhou Y.: *J. Liq. Chromatogr.* 17, 1695 (1994).
87. Wainer I. W., Brunner C. A., Doyle T. D.: *J. Chromatogr.* 264, 154 (1983).
88. Frank H., Nicholson G. J., Bayer E.: *J. Chromatogr. Sci.* 15, 174 (1977).
89. König W. A., v knize: *The Practice of Enantiomeric Separations by Capillary Gas Chromatography* (Bertsch W., Jennings W. G., Kaiser R. E., eds.). Hüthig, Heidelberg 1987.
90. König W. A.: *Kontakte Darmstadt* 2, 3 (1990).
91. Bergman T., Jörnvl H., v knize: *Techniques in Protein Chemistry 3* (Angletti R. H., ed.). Academic, San Diego 1992.

92. Armstrong D. W., Tang Y., Ward T., Nichols M.: *Anal. Chem.* 65, 1114 (1993).
93. D'Hulst A., Verbeke N.: *J. Chromatogr.* 608, 275 (1992).
94. Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen J. R.: *Chirality* 6, 496 (1994).
95. Pollock G. E., Jermamy D.: *J. Chromatogr. Sci.* 8, 296 (1970).
96. Armstrong D. W., Jin H. L.: *J. Chromatogr.* 462, 219 (1989).
97. Mosandl A., Günther C., Gessner M., Deger W., Singer G., Heusinger G.,  
v knize: *Bioflavour '87, Analysis – Biochemistry Biotechnology* (Schreier P.,  
ed.). de Gruyter, Berlin 1988.
98. Tressl R., Engel K. H., v knize: *Analysis of Volatiles – Methods and  
Applications* (Schreier P., ed.). de Gruyter, Berlin 1984.
99. Faber B., Dietrich A., Mosandl A.: *J. Chromatogr. A* 666, 161 (1994).
100. König W. A., Benecke I., Lucht N., Schmidt E., Schulze J., Sievers S.:  
*Proceedings of the 5th International Symposium on Capillary Chromatography*  
(Rijks J., ed.). Elsevier, Amsterdam 1983.
101. Koppenhoefer B., Allmendinger H., Nicholson G. J., Byaer E.: *J. Chromatogr.*  
260, 63 (1983).
102. Rettinger K., Burschka C., Scheeben P., Fuchs H., Mosandl A.: *Tetrahedron:  
Asymetry* 2, 965 (1991).
103. Armstrong D. W., Chang C. D., Li W. Y.: *J. Agric. Food Chem.* 38, 1674  
(1990).
104. König W. A., Krebber R., Mischnick P.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 12, 732  
(1989).
105. Armstrong D. W., Zukowski J.: *J. Chromatogr. A* 666, 445 (1994).
106. Zukowski J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 14, 361 (1991).