

V této práci byla vyvíjena a následně optimalizována enantioselektivní HPLC metoda s UV a fluorimetrickou detekcí pro chirální separaci čtyř aminokyselin (D/L-alanin, D/L-valin, D/L-leucin, D/L-isoleucin) v nativní a zejména derivatizované podobě s důrazem na enantioseparaci D-analogů. Retenční a enantioseparační chování studovaných analytů bylo sledováno na třech chirálních stacionárních fázích založených na bázi teikoplaninu (Chirobiotic T, Chirobiotic T2) a teikoplanin aglykonu (Chirobiotic TAG). Na koloně Chirobiotic T byly provedeny enantioseparace nederivatizovaných aminokyselin za UV detekce při 205 nm v mobilní fázi methanol/voda v různém objemovém poměru a bylo dosaženo úplného rozlišení L- a D-forem až na základní linii avšak s velmi nízkou citlivostí detekce. Pro její zvýšení byla provedena derivatizace aminokyselin pomocí 9-fluorenylmethylchloromravenčanu (FMOC-Cl). Průběh derivatizačního postupu byl sledován na koloně Chirobiotic T s fluorimetrickou detekcí ( $\lambda_{\text{Ex}} = 254 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 314 \text{ nm}$ ) v pufrované mobilní fázi methanol/0,5% triethylamoniumoctanový (TEAA) pufr, pH 6,0 40/60 (v/v). Z hlediska derivatizace se jako nejvhodnější jevil objemový poměr 1/1 D/L-aminokyselina/derivatizační činidlo s desetinasobně vyšší koncentrací derivatizačního činidla. Pro studium retenčního a enantioseparačního chování derivatizovaných FMOC-aminokyselin na testovaných kolonách s fluorimetrickou detekcí byly použity mobilní fáze složené z methanolu v kombinaci s 0,5 nebo 1,0% vodným roztokem TEAA pufru o pH v rozsahu 4,0 – 7,0 v různých objemových poměrech. Byl sledován vliv obsahu methanolu, tak i složení a pH vodné složky mobilní fáze na vybrané retenční a enantioseparační parametry analytů. Jako nejvhodnější se jevila kolona Chirobiotic T na které bylo dosaženo úplné separace FMOC-derivátů D-Val, D-Ala a D-Leu a téměř úplné separace všech čtyřech derivátů D-aminokyselin ve směsi v mobilní fázi o složení methanol/0,5 (1,0)% TEAA pufr, pH 6,0 40/60, respektive 38/62 (v/v). Za optimalizovaných podmínek byla provedena kvantifikace jednotlivých FMOC-D- a FMOC-L-enantiomerů i FMOC-D-enantiomerů ve směsi. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 1,9 – 76,1 ng/ml. Na kolonách Chirobiotic T2 a Chirobiotic TAG nebylo v žádném z testovaných separačních systémů dosaženo alespoň částečné separace FMOC-D-forem studovaných aminokyselin. Na koloně Chirobiotic TAG byly kvantifikovány pouze jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery aminokyselin Val, Leu a Ile.