

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Pavel Repko

Využití chirálních stacionárních fází na bázi teikoplaninu a teikoplanin aglykonu pro enantioseparaci FMOC-derivatizovaných aminokyselin

Use of chiral stationary phases based on teicoplanin and teicoplanin aglycone for enantioseparation of FMOC-derivatized amino acids

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha, 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM00221620857 a grantu GA AV IAAX 00100903.

Prohlášení:

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

V Praze,

.....

podpis

Rád bych touto cestou chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. za starostlivé vedení, ochotu a cenné rady při řešení a zpracovávání výsledků této diplomové práce. Dále děkuji kolektivu v laboratoři za vytvoření přátelského pracovního prostředí a také své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala.

ABSTRAKT

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.

ABSTRACT

In this work, an enantioselective HPLC method with UV and fluorimetric detection was developed and subsequently optimized for chiral separation of four aminoacids (D/L-alanine, D/L-valine, D/L-leucine, D/L-isoleucine) in native and particularly in derivatized form with an emphasis on enantioseparation of D-analogues. Retention and enantioseparation behavior of studied analytes was investigated on three chiral stationary phases based on teicoplanin (Chirobiotic T, Chirobiotic T2) and teicoplanin aglycone (Chirobiotic TAG). At the Chirobiotic T column, enantioseparations of underivatized aminoacids were performed with UV detection at 205 nm in the mobile phases methanol/water with different volume ratios. Baseline separation of L- and D-forms was achieved, however, the sensitivity of detection was very low. In order to increase detection sensitivity, derivatization of aminoacids was performed using 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) and the derivatization procedure was monitored on Chirobiotic T column with fluorimetric detection ($\lambda_{\text{Ex}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 314 \text{ nm}$) in a buffered mobile phase methanol/0.5% TEAA buffer, pH 6.0 40/60 (v/v). In terms of derivatization, volume ratio D/L-aminoacid/derivatization agent 1/1 with ten times higher concentration of derivatization agent was found to be the most suitable. Mobile phases consisting of methanol in combination with 0.5 or 1.0% water solution of TEAA buffer with pH range 4.0 – 7.0 in various volume ratios were used for study of retention and enantioseparation behavior of derivatized FMOC-aminoacids on all tested columns. Influence of methanol content as well as composition and pH value of aqueous component of mobile phase was studied. The Chirobiotic T column appeared to be the most suitable as it provided complete separation of FMOC-derivatives of D-Val, D-Ala and D-Leu and nearly complete separation all four D-aminoacid derivatives in the mixture in the mobile phase consisting of methanol/0.5 (1.0)% TEAA buffer, pH 6.0 40/60 and 38/62 (v/v), respectively. Under the optimized conditions, quantification of individual FMOC-D- and FMOC-L-enantiomers as well as FMOC-D-enantiomers in mixture was performed. Limits of detection ranged from 1.9 to 76.1 ng/ml. On Chirobiotic T2 and Chirobiotic TAG columns, no partial separation of FMOC-D-forms of aminoacids was observed for any of the tested separation systems. Only FMOC-L- and FMOC-D-enantiomers of Val, Leu and Ile were quantified on Chirobiotic TAG column.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1 Stereoizomery	11
2.2 Princip enantioseparace v HPLC	13
2.3 Chirální stacionární fáze	15
2.4 Makrocyclická antibiotika	16
2.4.1 Teikoplanin	17
2.4.2 Teikoplanin aglykon	19
2.4.3 CSP s odlišným stupněm pokrytí teikoplaninem.....	20
2.5 Derivatizace v HPLC	21
2.6 Aminokyseliny	22
2.6.1 Strukturální vzorce a názvy L-aminokyselin studovaných v této diplomové práci.....	25
2.7 Derivatizace aminokyselin pomocí chirálních i achirálních derivatizačních činidel v HPLC	26
2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1 Chemikálie	30
3.2 Přístroje a pomůcky	31
3.3 Příprava vzorků a činidel	32
3.4 Mobilní fáze a podmínky měření.....	33
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	34
4.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin v mobilní fázi methanol/voda	34
4.2 Derivatizace studovaných aminokyselin.....	38
4.3 Separace FMOC-aminokyselin v mobilní fázi methanol/voda s UV detekcí...38	
4.4 Sledování vhodných derivatizačních podmínek v pufované mobilní fázi pomocí UV detekce	41
4.5 Optimalizace průběhu derivatizace s fluorescenční detekcí	42

4.6	Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic T za vybraných podmínek derivatizace v pufrované mobilní fázi s fluorescenční detekcí	48
4.6.1	Kalibrační závislosti FMOC-aminokyselin.....	59
4.6.1.1	Kalibrační závislosti jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin ...	59
4.6.1.2	Kalibrační závislosti derivátů D-enantiomerů ve směsi tří FMOC-D/L-aminokyselin	61
4.6.1.3	Kalibrační závislosti derivátů D-enantiomerů v směsi čtyř FMOC-D/L-aminokyselin	63
4.7	Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin v pufrované mobilní fázi na koloně Chirobiotic T2.....	66
4.8	Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin v pufrované mobilní fázi na koloně Chirobiotic TAG	72
4.8.1	Kalibrační závislosti jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin	79
4.9	Vzájemné zhodnocení retenčního a enantioseparačního chování FMOC-D/L aminokyselin na všech třech studovaných chirálních stacionárních fázích	81
5.	ZÁVĚR	84
	POUŽITÁ LITERATURA.....	88

Seznam zkratk a symbolů

A	plocha píku
ACN	acetonitril
α	separační faktor
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (z angličtiny branched chain amino acids)
CDR	chirální derivatizační činidlo
CE	kapilární elektroforéza
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
DCT	dichlor-s-triazin
D/L-Ala	D/L-alanin
D/L-Ile	D/L-isoleucin
D/L-Leu	D/L-leucin
D/L-Val	D/L-valin
FDAA	1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alaninamid
FM-OH	9-fluorenylmethanol
FMOC-Cl	9-fluorenylmethylchloromravenčan
FMOC-OH	9-fluorenylmethoxykarboxylová kyselina
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IBLC	<i>N</i> -isobutyryl-L-cystein
k	retenční faktor
λ	vlnová délka
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
MA	makrocyclická antibiotika
MeOH	methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
NAC	<i>N</i> -acetyl-L-cystein
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd

PHES	fenylisothiokyanát
pI	izoelektrický bod
pK_a	disociační konstanta
R	rozlišení
TEA	triethylamin
TEAA pufr	triethylamoniumoctanový pufr
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t_M	mrtvý čas kolony
t_R	retenční čas analytu
v/v	objem/objem (objemový poměr složek mobilní fáze)
w	šířka píku při základně

1. ÚVOD

V současné době je v oboru analytické chemie věnována velká pozornost analýze opticky aktivních látek mezi které patří jak přírodní, tak i synteticky připravené sloučeniny. Tyto chirální látky, resp. jejich enantiomery lišící se prostorovým uspořádáním mohou mít odlišné biologické i fyziologické vlastnosti. V oblasti farmaceutické syntézy a následné aplikaci léčiv tato skutečnost vstupuje významně do popředí, jelikož při běžné syntéze vzniká obvykle racemát (směs obsahující ekvivalentní množství molekul obou enantiomerů). Jako následek rozdílných stereoselektivních interakcí s receptory, pak může jeden enantiomer vykazovat požadovaný terapeutický účinek, zatímco druhý může být vysoce toxický či neaktivní. Další široká oblast, ve které je věnována zvýšená pozornost enantiomernímu složení, jsou potraviny. Nejdůležitějšími chirálními složkami potravin jsou aminokyseliny s nutričně využitelnými L-enantiomery. Enantiomerní poměr L- a D- forem lze využít jako vhodný parametr k posuzování kvality potravin informující o způsobu technologického zpracování, podmínkách skladování či o přítomných nežádoucích aditivech. Navíc se v posledních letech, zejména L-aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA), staly významnou součástí komerčně dostupných výživových doplňků užívaných zejména sportovci. Již v průběhu výrobního procesu nebo při nevhodném skladování těchto preparátů mohou vznikat D-formy příslušných aminokyselin, což může negativně ovlivnit výživovou hodnotu finálního produktu. V souvislosti s těmito poznatky je proto nutné stále vyvíjet nové enantioseparační postupy, které by umožnily rychle, účinně a selektivně rozlišit i stanovit enantiomerní složení složek potravin, léčiv a jiných průmyslově vyráběných preparátů. Jako vhodnou metodou k tomuto účelu se stala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Stanovení většiny aminokyselin je však komplikováno nízkou citlivostí detekce v UV oblasti. Pro zvýšení citlivosti metody je proto nutné aminokyseliny derivatizovat vhodným činidlem.

Tato práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci enantioselektivní HPLC metody využívající chirální stacionární fáze na bázi teikoplaninu a teikoplanin aglykonu, která by umožnila rozlišit a kvantifikovat balastní, minoritní D-enantiomery čtyř vybraných aminokyselin po jejich derivatizaci fluorescenčním činidlem 9-fluorenylmethylchloromravenčanem.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stereoizomery

Prostorové izomery (stereoizomery) jsou molekuly složené ze stejného počtu a typů atomů i chemických vazeb (mají tedy stejnou strukturu a tím i sumární vzorec), ale jejich prostorové uspořádání je odlišné. S uspořádáním atomů a vazeb v prostoru úzce souvisí vlastnost molekuly označovaná jako chiralita (z řeckého slova *chiros* – ruka).¹ Chirální molekulou je molekula, která je neztotožnitelná se svým zrcadlovým obrazem. Naopak molekuly, které lze ztotožnit se svými zrcadlovými obrazy, jsou achirální. Významnou roli v chiralitě molekuly zastávají prvky symetrie přesněji střed a rovina symetrie či rotačně reflexní osa symetrie.² Jestliže není některý z těchto prvků symetrie v molekule přítomen, je molekula asymetrická a tím i chirální. S chiralitou je úzce spjata optická aktivita látek. Všechny opticky aktivní látky mají chirální molekuly a jejich charakteristickou vlastností je schopnost stáčet rovinu polarizovaného světla definované vlnové délky o určitý měřitelný úhel α doleva (–) či doprava (+).¹

Chiralita molekuly je zpravidla zapříčiněna přítomností tzv. stereogenního centra (chirálního centra), kterým je nejčastěji atom uhlíku se čtyřmi různými substituenty.³ Mohou to být ale i jiné atomy, např. křemík, síra, dusík či fosfor. Asymetricky substituovaný atom však nemusí být vždy jedinou příčinou vyvolávající chiralitu molekuly. Lze rozlišit dále např. chiralitu axiální u disubstituovaných binaftylů, vyvolanou bráněnou rotací atomů kolem jednoduché vazby tzv. atropizomerismus.^{4,5}

Dvě chirální molekuly, které jsou zrcadlovými obrazy jedna druhé se nazývají enantiomery. Enantiomery mají prakticky totožné fyzikálně-chemické vlastnosti, např. teplotu tání, teplotu varu, rozpustnost, hustotu aj. Vzájemně se odlišují opačnou absolutní konfigurací na stereogenních centrech a po průchodu rovinně polarizovaného světla jejich roztokem také znaménkem optické otáčivosti, tedy pouze směrem otáčení roviny polarizovaného světla nikoliv hodnotou, která je vždy stejná.³ Směs obsahující ekvimolární množství enantiomerních molekul se nazývá racemát.¹ Pro tuto směs je charakteristické, že je opticky neaktivní, jelikož optické otáčivosti jednotlivých enantiomerů v ní obsažených se navzájem ruší. Mezi enantiomery může docházet k tzv.

interkonverzi (přeměně jednoho enantiomeru ve druhý), která vede až ke vzniku racemátu.

Jiné stereoizomery než enantiomery, které nejsou vzájemnými zrcadlovými obrazy a nelze je ztotožnit, se nazývají diastereoizomery.^{1,2} Tyto molekuly obsahují více než jedno stereogenní centrum. Od enantiomerů se liší již odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi i hodnotou optické otáčivosti a tím, že mají opačnou absolutní konfiguraci pouze na některých stereogenních centrech. Zvláštním typem diastereoizomerů jsou diastereoizomery typu *meso*. Tyto molekuly obsahují sice stereogenní centra, ale i přesto jsou achirální, jelikož obsahují rovinu symetrie.

K vyjádření absolutní konfigurace na stereogenním centru slouží podle zavedené konvence autorů Cahna, Ingolda a Preloga (tzv. CIP systém) symboly *R* a *S*, které se předřazují před název sloučeniny.³ U sacharidů, aminokyselin a peptidů se k rozlišení absolutní konfigurace na asymetricky substituovaném atomu uhlíku dosud používá označení *D* a *L* vyplývající z Fischerovy projekce.¹

Živé organismy představují chirální prostředí, které je schopno rozlišit jednotlivé enantiomery. Stereoselektivní interakce dílčích enantiomerů s receptory mohou vyvolat rozdílné biologické a fyziologické účinky na lidský organismus. Toto odlišné působení je významné nejen v oblasti farmakologie⁶, ale i při kontrole složek potravin či v zemědělství při aplikaci agrochemikálií.⁷ Uvádí se, že až 80 % farmaceutických chirálních sloučenin je distribuováno v podobě racemátu. U celé řady chirálních léčiv byly u jednotlivých enantiomerů pozorovány výrazné rozdíly v toxicitě či terapeutických účincích. Příkladů lze nalézt mnoho.^{8,9} Například racemát thalidomidu, který byl v 60. letech minulého století podáván těhotným ženám jako lék proti ranní nevolnosti. Teprve později bylo prokázáno, že *R*-enantiomer má sice sedativní účinky, ale jeho *S*-analog je silně teratogenní. Navíc jestliže je podán pouze *R*-thalidomid dochází k racemizaci *in vivo* a vzniku opačného enantiomeru s teratogenními vlastnostmi.¹⁰ U penicilaminu působí *R*-enantiomer jako antiarytmikum, zatímco *S*-enantiomer je extrémně toxický.⁷ V řadě případů vykazuje jeden z dvojice enantiomerů vyšší terapeutickou aktivitu, vyvolanou silnější interakcí s příslušnými receptory. Methadon je centrálně působící analgetikum. Uvádí se, že *R*-methadon má asi 25 až 50krát silnější analgetický účinek než jeho *S*-protějšek. Obdobné je to i u antiarytmika verapamilu, u kterého je *S*-enantiomer přibližně 10 až 20krát účinnější než jeho *R*-

analog.¹¹ Další rozdíly lze nalézt, např. u askorbové kyseliny a nesteroidního protizánětlivého léku ibuprofenu, u nichž je aktivita spjata pouze s *S*-formou a *R*-enantiomery jsou neaktivní.

2.2 Princip enantioseparace v HPLC

Rozlišení racemátu v jednotlivé enantiomery (chirální separace) patří k obtížným separačním úkolům, jelikož v běžném nechirálním prostředí vykazují enantiomery shodné vlastnosti a tím i stejné separační chování a jsou tedy vzájemně nerozlišitelné. Pro jejich rozdělení je proto nutné zajistit v separačním systému chirální neracemické podmínky.¹ Existují dva základní přístupy, jak lze chirální separaci v HPLC uskutečnit, a to buď přímým, či nepřímým způsobem.¹²

Přímá metoda dělení enantiomerů je založena na zavedení vhodné opticky aktivní látky tzv. chirálního selektoru (CS) do separačního prostředí. Při interakci mezi chirálním selektorem a enantiomery vznikají přechodné (labilní) diastereoizomerní komplexy o příslušných konstantách stability. Jestliže jsou tyto konstanty dostatečně odlišné, může docházet na koloně k delšímu zadržení jednoho z dvojice enantiomerů a tím i k vzájemnému rozdělení. Chirální selektor může být navázán na pevném inertním nosiči (nejčastěji silikagelu) a vytvářet tak chirální stacionární fázi (CSP) nebo jej lze přidat do mobilní fáze pouze jako aditivum.¹³ Přímou separaci enantiomerů lze tedy uskutečnit buď na CSP s nechirální mobilní fází nebo v systému s nechirální stacionární fází a chirální mobilní fází.¹² Oba způsoby provedení mají své výhody i nevýhody. Mezi výhody přidavku chirálního selektoru do mobilní fáze patří široký výběr i snadná výměna chirálního selektoru a možnost použití levnější nechirální stacionární fáze, obecně vykazující vyšší separační účinnost. I přes uvedené výhody separačního systému s chirální mobilní fází je toto uspořádání v praxi méně využíváno, jelikož má i svá omezení a úskalí, např. velkou spotřebu často velmi drahého chirálního selektoru, omezenou rozpustnost a menší stabilitu chirálního selektoru v mobilní fází a v neposlední řadě také snížení citlivosti UV detekce, vyvolané možnou absorpcí selektoru v mobilní fází.^{14,15}

Při nepřímé metodě dělení enantiomerů je analyt nejprve před vlastní separací derivatizován opticky čistým chirálním derivatizačním činidlem (CDR)¹⁶, tj. pouze

jedním enantiomerem. Reakcí vzniká stabilní pár diastereoizomerů, které lze díky odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem separovat již v běžném nechirálním prostředí za použití achirální stacionární fáze. Právě možnost použití účinnější achirální kolony při enantioseparacích je nespornou výhodou nepřímých metod. Na úspěch nepřímé separace má vliv řada okolností.⁷ Nejdůležitější je znalost enantiomerní čistoty derivatizačního činidla. Přítomnost i druhého enantiomeru derivatizačního činidla při reakci by totiž měla za následek chybnou kvantifikaci analyzovaných enantiomerů. Dále je nezbytné, aby derivatizační reakce proběhla úplně, bez případné racemizace či epimerizace a obě chirální centra ve vzniklých diastereoizomerech byla v těsné blízkosti (ve vzdálenosti 2–3 vazeb), aby rozdíl v chromatografických vlastnostech byl co největší. I přes některé nevýhody se nepřímá chirální separace v HPLC používá, např. při enantioseparacích racemických léčiv v biologických vzorcích.¹⁷

Princip enantioselektivního rozpoznávání vychází z původní představy vysoce stereospecifické interakce mezi enzymem a substrátem. Je popsán tzv. modelem tříbodové interakce, který v roce 1952 navrhl Dalgliesh k objasnění enantioseparace v adsorpční chromatografii.⁷ Podle tohoto modelu je pro úspěšné rozdělení dvojice enantiomerů nutné, aby mezi chirálním selektorem a enantiomerem probíhaly současně tři interakce, přičemž alespoň jedna z nich musí mít stereoselektivní charakter, tj. je ovlivnitelná prostorovým uspořádáním atomů. Stereoselektivní charakter zajistí, že u jednoho z enantiomerů může být některá z interakcí upřednostněna, což vede až k rozdílným afinitám jednotlivých enantiomerů k chirálnímu selektoru. Interakce, které se podílejí na stereodiskriminačním mechanismu mají charakter přitažlivých či odpudivých sil. Podle použitého typu chirálního selektoru a mobilní fáze se mohou na chirálním rozpoznávání současně podílet, např. π - π interakce, vodíková vazba, interakce elektrostatické, hydrofobní, dipólové či stericke stínění.¹⁴

2.3 Chirální stacionární fáze

K vytvoření účinného enantioselektivního separačního prostředí lze využít nejen techniky chromatografické jako je HPLC, plynová chromatografie (GC) či tenkovrstvá chromatografie (TLC), ale i metody elektromigrační, např. kapilární elektroforéza (CE). Při chirálních separacích metodou kapilární elektroforézy se obecně dosahuje dokonce účinnějších a rychlejších enantioseparací než v případě kapalinové chromatografie. I přes tuto skutečnost patří v současnosti metoda HPLC k nejrozšířeněji používaným metodám pro separace opticky aktivních látek. Jak již bylo popsáno dříve, při aplikaci přímého způsobu chirální separace je častěji využíván chromatografický systém s chirální stacionární fází než s chirální mobilní fází. Vytvoření CSP lze v kapalinové chromatografii realizovat buď kovalentním navázáním chirálního selektoru na silikagel nebo pouhým pokrytím nosiče chirálním selektorem (jedná se pouze o fyzikální interakci).¹⁸ Nevýhodou takto pokrývaných CSP je nízká teplotní stabilita a omezený výběr vhodných mobilních fází resp. organických rozpouštědel, jako modifikátorů mobilních fází. Výhodou je však vyšší počet možných interakčních míst, která nejsou blokována vazbou chirálního selektoru na nosič. Rozvoj aplikace kapalinové chromatografie v oblasti enantiomerní analýzy vedl k vyvinutí mnoha chirálních selektorů, resp. chirálních stacionárních fází.¹⁹ Při enantioseparacích je obecně kladen důraz na jejich vysokou účinnost a univerzálnost, tj. schopnost dělit co nejširší možný okruh strukturně odlišných chirálních analytů a možnost použít tyto fáze zároveň v různých separačních módech. Některé CSP jsou určeny pro konkrétní aplikační účely tzv. "šité na míru". Tento typ CSP vykazuje enantioselektivitu pouze k určité dvojici enantiomerů nebo velmi omezené skupině chirálních látek, čímž vytváří vysoce stereospecifické prostředí s možností aplikace i preparativního módu.¹⁴

K nejčastěji používaným CSP patří v dnešní době takové, které využívají jako chirální selektory derivatizované polysacharidy, makrocyclická antibiotika, cyklodextriny a jejich deriváty či proteiny. Jelikož v této práci byly použity CSP s navázaným teikoplaninovým nebo teikoplanin aglykonovým chirálním selektorem bude v následující části textu věnována větší pozornost pouze makrocyclickým antibiotikům, konkrétně glykopeptidům.

2.4 Makrocyclická antibiotika

Makrocyclická antibiotika (MA) vznikají jako fermentační produkty různých druhů bakterií. Podle struktury je lze rozdělit na čtyři základní skupiny – na ansamyciny (rifamycin B, rifamycin SV), glykopeptidy (vankomycin, teikoplanin, avoparcin a ristocetin A), polypeptidy (thiostrepton) a aminoglykosidy (kanamycin, streptomycin, fradiomycin B a C).²⁰ K nejvýznamnější skupině MA se řadí glykopeptidy. Tato antibiotika jsou aktivní jak proti aerobním, tak proti anaerobním grampozitivním patogenním bakteriím. Svou specifickou vazbou na karboxylový konec D-alanyl-D-alaninu přítomného v bakteriální buněčné stěně zamezují polymerizaci peptidoglykanu a tím vyvolávají inhibici syntézy buněčné stěny bakterií. Vankomycin a teikoplanin jsou využívány při léčbě závažných stafylokokových a streptokokových infekcích způsobených, např. methicillin rezistentní bakterií *Staphylococcus aureus* či bakterií *Enterococcus faecalis*.²¹⁻²³ O možnostech využití glykopeptidových makrocyclických antibiotik jako vhodných chirálních selektorů pro enantioseparace poprvé informoval v roce 1994 D. W. Armstrong.²⁴ Od této doby se staly, díky svým širokým aplikačním možnostem, jednou z nejpoužívanějších a nejužitečnějších tříd chirálních selektorů nejen v kapalinové chromatografii²⁵, ale i v kapilární elektroforéze.²⁶

Struktura glykopeptidových MA je poměrně komplikovaná. Molekuly obsahují velké množství stereogenních center a mnoho ionizovatelných kyselých i bazických funkčních skupin, čímž získávají amfoterní charakter. Z tohoto důvodu mohou být pozitivně nabité, záporně nabité nebo neutrální v závislosti na pH prostředí. Dále obsahují i hydrofobní a hydrofilní skupiny, resp. části. V důsledku této rozmanité struktury umožňují glykopeptidová MA celou řadu interakcí s chirálními analyty. Při chirální diskriminaci se mohou současně uplatňovat, např. iontové interakce, vodíková vazba, sterické, dipól–dipól či π – π interakce, stejně tak jako hydrofobní interakce. CSP na bázi glykopeptidů mají molekuly chirálního selektoru kovalentně navázané na silikagelový nosič.^{27,28} Při enantioseparacích metodou HPLC lze tyto CSP použít bez omezení ve všech chromatografických separačních módech, přičemž každý separační mód upřednostňuje jiné stereoselektivní i nestereoselektivní interakce. V reverzním separačním módu, který je nejčastěji realizován mobilní fází obsahující směs organického modifikátoru (methanol, ethanol, acetonitril) s vodou či vodným roztokem pufru, se uplatňují zejména hydrofobní interakce spolu s inkluzí analytu, popřípadě

elektrostatické interakce a vodíková vazba. V normálním separačním módu, kdy nepolární mobilní fázi tvoří alkan (*n*-pentan, *n*-hexan) s malými přísadkami polárnějšího rozpouštědla (např. propan-2-ol, ethanol), jsou preferovány vodíková vazba, popřípadě π - π a dipól-dipól interakce. Polárně organický mód byl poprvé použit v separačním systému s cykloextrinovými CSP.²⁹ Základem polární mobilní fáze je methanol případně v kombinaci s acetonitrilem a velmi malé množství přidané kyseliny (nejčastěji octové kyseliny) a báze (nejčastěji triethylaminu) pro ovlivnění retence a enantioselektivity.³⁰ Dominantní interakce, které v tomto separačním módu převažují, jsou elektrostatické interakce. Polárně organický mód je vhodný pro analyty, které ve své struktuře obsahují alespoň dvě ionizovatelné funkční skupiny nejlépe v blízkosti chirálního centra.³¹

Mezi výhody použití glykopeptidových CSP při enantioseparacích v HPLC patří nejen schopnost pracovat v různých separačních módech, ale i jejich vzájemná komplementarita, která je zapříčiněna strukturní podobností jednotlivých chirálních selektorů.³² Jestliže tedy na určité glykopeptidové CSP dojde pouze k částečné enantiomerní separaci daného analytu, je vysoká pravděpodobnost, že při zachování stejného nebo podobného složení mobilní fáze nastane na jiné CSP na bázi glykopeptidů úplná nebo lepší enantioseparace.²⁷

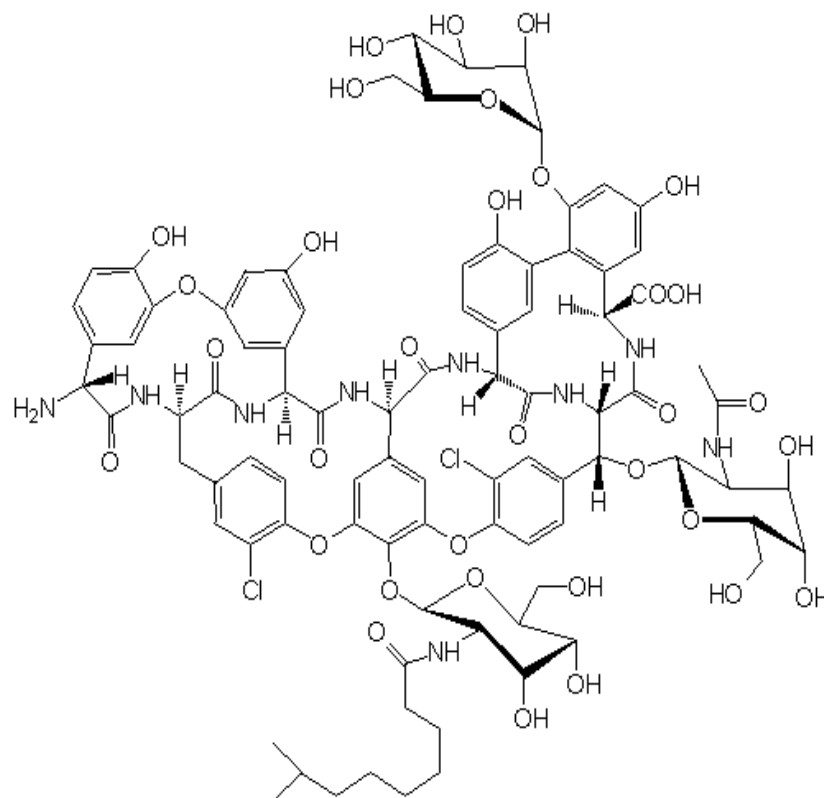
Chirální stacionární fáze na bázi glykopeptidových makrocyclických antibiotik umožňují díky svým unikátním vlastnostem účinně separovat široký okruh rozdílných enantiomerních sloučenin.³⁰ Neustálý zájem o tuto třídu chirálních selektorů vedl k vyvinutí pestré nabídky komerčně dostupných CSP na bázi glykopeptidů a jejich analogů, což výrazně zvyšuje jejich aplikační možnosti v oblasti enantiomerní analýzy. Díky této skutečnosti patří v dnešní době k jedněm z nejpoužívanějších CSP v HPLC.

2.4.1 Teikoplanin

Teikoplanin, známý také pod názvem teichomycin, je fermentačním produktem bakterie *Actinoplanes teichomyceticus*.³³ Molekula teikoplaninu (obr. 1) obsahuje celkem 23 stereogenních center. Její struktura se skládá z tzv. aglykonového koše, ke kterému jsou navázány přes etherové vazby tři monosacharidové jednotky, resp. dvě molekuly D-glukosaminu a jedna molekula D-mannosy. Základem aglykonového koše, který je tvořen čtyřmi makrocyclickými kruhy, je hexapeptidový řetězec. Na tomto

řetězci je navázáno celkem sedm benzenových jader, pět z nich je navzájem propojeno třemi etherovými skupinami. V molekule jsou přítomny čtyři fenolické zbytky a na jiných dvou aromatických kruzích jsou navázány atomy chloru. Aglykon navíc obsahuje samostatnou primární aminovou a karboxylovou skupinu, díky kterým molekula teikoplaninu získává amfoterní charakter. Důležitou strukturální charakteristikou teikoplaninu je to, že na jednom D-glukosaminu, resp. na 2-amino-2-deoxy- β -D-glukopyranosylovém zbytku je navázán hydrofobní acylový řetězec.²⁷ Přítomnost tohoto řetězce mastné kyseliny významně přispívá k agregačním schopnostem teikoplaninu a k jeho nižší rozpustnosti ve vodě oproti ostatním makrocyclickým glykopeptidům.³⁴ Bylo identifikováno celkem pět přírodně vyskytujících se forem teikoplaninových glykopeptidů, které se liší právě tímto acylovým řetězcem.³⁵ Přítomné monosacharidové jednotky na aglykonu mají důležitou roli pro průběh chirálního rozpoznávání. Tento proces mohou ovlivnit třemi způsoby: 1. sterickým bráněním vazebného místa na aglykonu; 2. blokováním možných interakčních míst (skupin) na aglykonu; 3. poskytováním dalších stereogenních center a skupin pro interakci s analytem.²³ Mezi velké přednosti teikoplaninu patří jeho komplementarita s ristocetinem A či vankomycinem.³⁶

CSP s navázaným teikoplaninem (komerčně dostupná pod názvem Chirobiotic T), je vhodná pro chirální rozlišení celé řady strukturálně rozdílných sloučenin. V literatuře jsou popsány enantioseparace nativních α - i β -aminokyselin a malých peptidů s velmi dobrým dosaženým rozlišením jednotlivých enantiomerů.^{35,37} Dále byly popsány enantioseparace *N*-blokovaných aminokyselin (např. *N-terc*-butyloxykarbonyl derivátů)³⁸, sekundárních α -aminokyselin³⁹, sulfoxidů⁴⁰, neutrálních aromatických sloučenin⁴¹ či substituovaných β -laktamů.⁴²

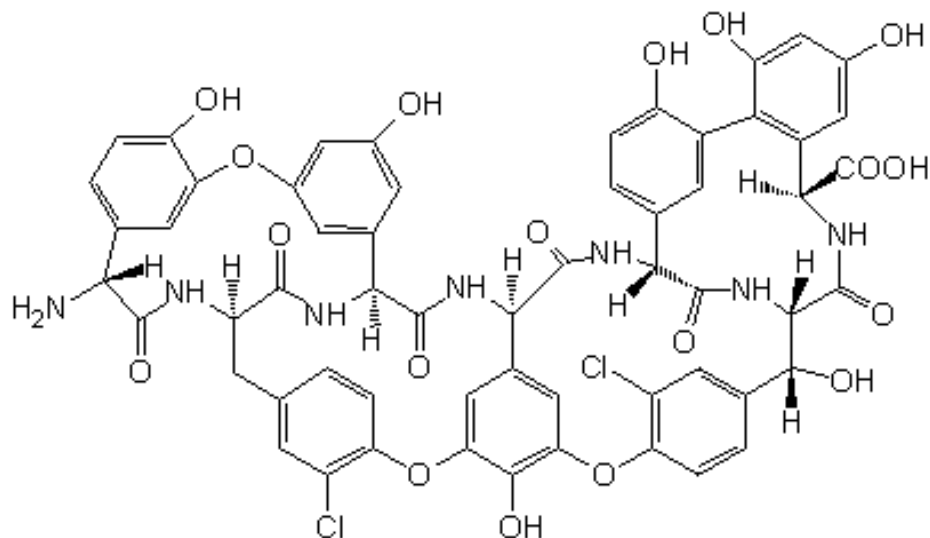


Obr. 1 Strukturální vzorec teikoplaninu

2.4.2 Teikoplanin aglykon

Odstraněním cukerných částí z molekuly teikoplaninu vzniká analog tohoto glykopeptidového chirálního selektoru – teikoplanin aglykon (TAG). Takto modifikovaný teikoplanin lze připravit organickou syntézou nebo také pouhou úpravou přírodního teikoplaninu.^{23,43} Molekula TAGu (obr. 2) má ve své struktuře, narozdíl od nativního teikoplaninu, pouze 8 stereogenních center a neobsahuje navázané cukerné zbytky včetně hydrofobního acylového řetězce připojeného právě k jedné monosacharidové jednotce. Tím je pro mnohé analyty získán snadnější přístup k aglykonové dutině obsahující stereogenní centra a řadu ionizovatelných funkčních skupin. Na CSP s navázaným teikoplanin aglykonem (komerčně dostupná pod názvem Chirobiotic TAG), bylo oproti teikoplaninové CSP dosaženo lepších hodnot enantiorozlišení, např. u některých běžných α -aminokyselin⁴⁴, řady sekundárních α -aminokyselin³⁹ i mnoha sulfoxidů.⁴⁰ Dále byly popsány i separace některých léčiv, např.

antihypertenziva pindololu.²³ Absence cukerných zbytků je zodpovědná za velmi špatnou rozpustnost TAGu ve vodě.²³



Obr. 2 Strukturní vzorec teikoplanin aglykonu

2.4.3 CSP s odlišným stupněm pokrytí teikoplaninem

Úsilí o zvýšení enantioselektivních schopností a kapacity teikoplaninové CSP vedlo k přípravě silikagelového nosiče s vyšším stupněm pokrytí chirálním selektorem, resp. CSP s vyšším obsahem (koncentrací) teikoplaninu. Tento typ CSP se zavedl do praxe pod komerčním názvem Chirobiotic T2 a od klasické teikoplaninové kolony (Chirobiotic T) se liší nejenom zvýšeným obsahem teikoplaninu, ale i délkou řetězce, který zprostředkovává vazbu mezi teikoplaninem a silikagelem. Spojovací řetězec je u kolony Chirobiotic T2 přibližně dvakrát delší než u kolony Chirobiotic T. Různá je taktéž vlastní porozita nosiče, přičemž velikost zrnění zůstává stejná, a to 5 μm . U kolony Chirobiotic T dosahuje porozita silikagelu 120 \AA , zatímco u kolony Chirobiotic T2 je 200 \AA .⁴⁵ Vyšší hodnota porozity zaručuje větší specifický povrch nosiče a přibližně dvojnásobně delší spacer zlepšuje sterickou dostupnost vazby chirálního selektoru na silikagelel.⁴⁶ Dále vyšší stupeň pokrytí nosiče teikoplaninem poskytuje analytům více možných interakčních míst, což může vést k silnějším interakcím s enantiomery a k vytvoření lepšího stereodiskriminačního prostředí. Na koloně Chirobiotic T2 bylo oproti koloně Chirobiotic T získáno za totožných separačních

podmínek lepší enantiorozlišení, např. u některých β -aminokyselin⁴⁷ či amino alkoholů.³⁷

2.5 Derivatizace v HPLC

Derivatizace je obecně označována jako postup, při kterém se mění fyzikální a chemické vlastnosti analytu. Zatímco při separacích v GC má být jejím hlavním cílem zvýšení těkavosti analytů⁴⁸, v oblasti chirálních separací metodou HPLC jsou hlavními důvody jejího použití umožnění chirální separace jako takové, popřípadě zlepšení stávající separace nebo zvýšení citlivosti detekce. Jak již bylo popsáno dříve, reakce chirálního analytu s enantiomerně čistým derivatizačním činidlem předcházející separačnímu kroku vede ke tvorbě páru kovalentně vázaných diastereoizomerů. Takovýto způsob enantioseparace je označován jako nepřímý a na běžné achirální koloně může vést nejenom k vzájemnému rozlišení enantiomerů, ale i ke zvýšení citlivosti detekce, jestliže vzniklý derivát vykazuje, např. vyšší absorpenci než nederivatizovaný analyt. Při přímé metodě separace enantiomerů, kdy nedochází ke vzniku stabilního diastereoizomerního páru, lze derivatizaci využít zvláště ke zvýšení citlivosti detekce.¹⁴ Do molekuly analytu se reakcí s vhodným, tentokrát achirálním derivatizačním činidlem, vnese chromofor (pro UV detekci) nebo fluorofor (pro fluorescenční detekci). Nevýhodou derivatizace je především to, že do analytického postupu je nutné zařadit krok navíc, což může vést ke zvýšení chyby analýzy i celkové doby jejího trvání.

Vlastní derivatizační reakce by měla probíhat pokud možno rychle, kvantitativně a jejím produktem by měla být samostatná stabilní sloučenina, tzn. měla by mít minimum vedlejších produktů.⁴⁹ Na druhou stranu, jestliže při reakci vzniká více produktů, může tato informace přispět k pochopení samotného interakčního mechanismu. Derivatizaci analytu lze docílit různými cestami. V závislosti na experimentálním uspořádání a místu provedení reakce se rozlišuje derivatizace předkolonová (probíhá před kolonou), která je nejpoužívanější, dále derivatizace postkolonová (probíhá za kolonou) a derivatizace přímo v koloně.⁵⁰

Mezi funkční skupiny analytů, na kterých probíhá nejčastěji derivatizace, patří aminoskupina a karboxylová či hydroxylová skupina. Za tímto účelem bylo vyzkoušeno

velké množství různých chirálních derivatizačních činidel.⁴⁹ Pro enantiomerní derivatizaci analytů obsahující ve své struktuře karboxylovou skupinu lze využít esterifikace s chirálními alkoholy nebo amidace aminy.^{51,52} V poslední době se dává přednost spíše derivatizaci s chirálními aminy např. L-leucinamidem.⁵³ Obecně je u těchto amidací nutné, aby při reakci byl přítomen nejenom samotný chirální amin, ale i aktivátor karboxylové skupiny. K aktivaci se nejčastěji využívají karbodiimidy^{54,55}, které po reakci přecházejí na reaktivní *N*-acyl-deriváty močoviny. Dále lze jako aktivátory využít thionyl chlorid, chloromravenčany a 1,1-karbonyldiimidazol, které jednotlivě vedou k tvorbě chloridů kyselin, smíšených anhydridů a *N*-acylimidazolovým derivátům. K enantiomerní derivatizaci analytů s hydroxylovými skupinami se používají taktéž různá esterifikační činidla, zejména různé chirální kyseliny či jejich deriváty nebo acylkyanidy.^{49,56} S ohledem na zaměření této diplomové práce bude derivatizace aminové funkční skupiny podrobněji popsána v pozdější části tohoto teoretického úvodu.

2.6 Aminokyseliny

Aminokyseliny, sacharidy a jejich oligomery a polymery jsou obecně považovány za základní stavební jednotky života.⁵⁷ Všechny proteinogenní aminokyseliny (celkem 20) jsou α -aminokyseliny, tedy aminová funkční skupina je vůči karboxylové vždy v poloze α . Tyto aminokyseliny, kromě glycinu, obsahují ve své struktuře asymetricky substituovaný atom uhlíku, který jim zaručuje právě to, že mohou existovat ve dvou enantiomerních formách a to buď L či D. Všeobecně se má za to, že biologické makromolekuly jsou homochirální, tedy takové, že ve své molekule obsahují stereogenní centra o stejné konfiguraci.⁵⁸ Drtivá většina peptidů a proteinů v živém organismu je složena z L-forem aminokyselin. Příčinou této homochiraloty může být skutečnost, že L-aminokyseliny jsou stabilnější než jejich D-analogy.⁵⁹ To, že jsou proteiny výhradně složeny z L-aminokyselin, tedy podle přísného geometrického pravidla, pak předurčuje i jejich specifitu, např. ve vazbě substrátu do vazebného místa enzymu či stereospecifitu katalyzované reakce.⁶⁰ V nukleových kyselinách či jiných glukokonjugátech je pro přítomné sacharidy, narozdíl od aminokyselin v proteinech, typická D-konfigurace.⁷ Přítomnost D-aminokyselin nebo L-sacharidů v přírodě je

vzácná nebo je následkem neobvyklých přeměn. Z tohoto důvodu se předpokládá, že při biologických procesech vznikají pouze enantiomerně čisté sloučeniny, zatímco při běžné chemické syntéze vzniká obvykle racemát.⁵⁸

Chirální separace aminokyselin mají důležité postavení v oblasti analýzy složek potravin a výživových doplňků užívaných zejména sportovci. Je známo, že většina hydrofobních L-aminokyselin chutná hořce, zatímco jejich D-analogy jsou velmi sladké.⁷ V potravinách jsou obsaženy přírodní sloučeniny, některé se zde vyskytují pouze jako čisté enantiomery, jiné jsou přítomné v určitém specifickém enantiomerním poměru.⁵⁹ Mezi nejvýznamnější chirální složky potravin patří právě aminokyseliny. Přítomnost balastních, tedy nežádoucích D-aminokyselin v potravinách může být užitečnou pomůckou k posuzování kvality potravin. Jejich zvýšené množství může vypovídat mnoho o nevhodném způsobu technologického zpracování, podmínkách skladování či o přítomných nežádoucích syntetických příměsích (obvykle racemických).⁵⁸ Všechny aminokyseliny přítomné v proteinech podléhají racemizaci, avšak s odlišnými rychlostními konstantami. Rychlost racemizace a tím i enantiomerní poměr může být u jednotlivých aminokyselin ovlivněn i vnějšími podmínkami, kterým je daná potravina vystavena. Mohou to být, např. vysokoteplotní či fermentační procesy, ozáření či extrémní hodnoty pH aj.¹⁴ Jestliže se při zpracování potravin uplatňují vysoké teploty nebo silně alkalické prostředí, může docházet vlivem racemizace aminokyselin obsažených v proteinech ke vzniku jiných než LL- peptidových vazeb.⁶¹ Proteolytické enzymy přítomné v organismu pak takto modifikované proteiny nedokáží účinně štěpit a dále efektivně využít při metabolismu. Tato skutečnost vede až ke snížení výživové hodnoty dané potraviny.⁶² Teplotní vliv na racemizaci byl zkoumán, např. u aminokyselin a proteinů přítomných v mléce. Závěry tohoto výzkumu ukázaly, že za běžně používaných průmyslových podmínek při zpracování mléka nedochází vlivem jeho krátkodobého vystavení vysoké teplotě k racemizaci přítomných aminokyselin.⁵⁸ Naopak racemizace vyvolaná vysokou teplotou byla pozorována u vybraných L-aminokyselin v sojových bobech.⁶³ Bylo zjištěno, že teplota nad 140 °C vedla u některých analytů a to zejména u L-fenylalaninu, L-serinu a L-glutamové kyseliny k přeměně na jejich D-analogy. Podle charakteristického enantiomerního složení aminokyselin získaného před i po upražení kávy lze dokonce rozlišit i její jednotlivé druhy.⁶⁴

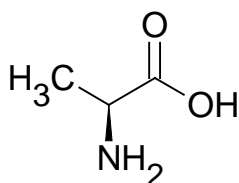
Přítomnost volných D-aminokyselin ve fermentovaných potravinách, jako jsou např. zrající sýry, jogurty, pivo, víno či ocet, je přirozená.⁵⁸ V hojném zastoupení byly v těchto potravinách nalezeny zejména D-alanin, D-glutamová kyselina a D-asparagová kyselina. Příčinou je to, že tyto D-aminokyseliny jsou součástí peptidoglykanu buněčné stěny mnoha bakterií⁶⁵ odkud se mohou uvolňovat do svého okolí nebo je jejich zdrojem působení bakteriálních racemas či epimeras, které katalyzují přeměnu L-aminokyselin na jejich D-analogy.¹⁴ Zvláště množství D-asparagové kyseliny, která je produkována pouze bakterií *Lactobacillus bulgaricus*, slouží jako vhodný a rychlý parametr k měření koncentrace této bakterie v jogurtu.⁵⁸

Je tedy zřejmé, že D-aminokyseliny v potravinách mohou být bakteriálního původu. Na základě této skutečnosti lze přítomnost D-aminokyselin v nekvašených či nijak nezpracovaných potravinách využít jako vhodný ukazatel mikrobiální kontaminace.^{66,67} Nezpracované mléko je zpravidla kontaminováno anaerobními bakteriemi, které se vyskytují v bachoru krav. Jejich přítomnost má za následek nízké, avšak významné koncentrace některých D-aminokyselin v mléce.⁵⁸ Byly nalezeny, např. D-alanin, D-leucin, D-serin či D-tryptofan.⁶⁸ Bylo také prokázáno, že vyšší množství zejména D-alaninu, D-valinu a D-glutamové kyseliny může souviset s mastitidou (zánětem vemene).⁶⁹ Další skupinou nekvašených potravinových výrobků, kde lze na základě enantioseprace aminokyselin hodnotit kvalitu produktu, jsou např. různé ovocné či zeleninové džusy a med. V ovocných nápojích se používají levné syntetické směsi aminokyselin (obvykle racemické) k zamaskování zředění produktu vodou, což výrazně snižuje kvalitu nápoje.⁷⁰ V pomerančových džusech byly nalezeny racemáty aminokyselin alaninu, prolinu, serinu, argininu, asparaginu, glutamové kyseliny či asparagové kyseliny.⁷¹ Na druhou stranu bylo zjištěno, že přítomnost D-alaninu, D-argininu, D-glutamové kyseliny a D-asparagové kyseliny v džusech z pomerančů je přirozená a může být způsobena přítomností mikroorganismů nebo pocházet z rostlinných zdrojů.⁶¹ Podobné enantiomerní složení D-aminokyselin bylo nalezeno i v grepovém džusu.⁷² Výsledky enantioselektivní analýzy aminokyselin v medu ukázaly přítomnost různých D-aminokyselin, např. D-alaninu, D-leucinu či D-fenylalaninu.⁷² Podle enantiomerního poměru vybraných aminokyselin lze dokonce zjistit nejen dobu skladování a podmínky, za kterých byl med vyráběn, ale i informace o bylinném a zeměpisném původu medu.⁵⁹

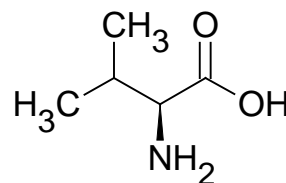
Jak bylo dříve uvedeno, enantiselektivní analýza aminokyselin nemusí být jen užitečnou pomůckou k hodnocení kvality různých druhů potravin. V poslední době našla také uplatnění při kontrole enantiomerní čistoty doplňků stravy určených lidem s nadměrnou fyzickou zátěží (např. sportovců). V těchto potravinových doplňcích jsou obsaženy především L-aminokyseliny s rozvětveným postraním hydrofobním řetězcem konkrétně: L-valin, L-leucin a L-isoleucin. Tyto aminokyseliny jsou označovány zkratkou BCAA (branched chain amino acids) a patří do skupiny esenciálních aminokyselin. Lidský organismus si je nedokáže sám syntetizovat, a proto musejí být do organismu dodávány potravou. Při metabolismu přecházejí přímo z krevního oběhu do svalových buněk, kde slouží jako okamžitý zdroj energie. Z tohoto důvodu jsou schopné chránit svaly před jejich poškozením a mohou také přispívat ke zvýšení jejich objemu. Po namáhavém fyzickém výkonu podporují snižování únavy v důsledku zvyšování hladiny serotoninu v centrální nervové soustavě, který na organismus působí povzbudivě. Navíc napomáhají udržovat stálou hladinu cukru v krvi.⁷³ Tuto biologickou aktivitu vykazují pouze L-enantiomery příslušných aminokyselin. Jejich D-analogy mohou v těchto komerčně dostupných preparátech vznikat v průběhu výrobního procesu nebo jako následek nevyhovujících podmínek při skladování. Proto je velmi důležité kontrolovat enantiomerní čistotu daných výrobků, aby nedocházelo k výživovým ztrátám díky vzniku nemetabolizovatelných a biologicky nevyužitelných forem těchto aminokyselin.^{59,74}

2.6.1 Strukturální vzorce a názvy L-aminokyselin studovaných v této diplomové práci

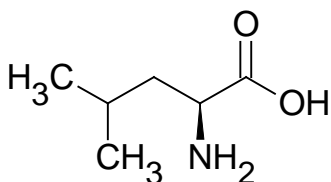
L-alanin (L-Ala)



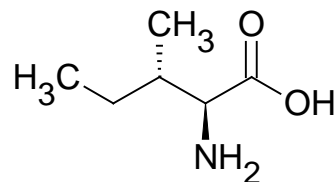
L-valin (L-Val)



L-leucin (L-leu)



L-isoleucin (L-Ile)



2.7 Derivatizace aminokyselin pomocí chirálních i achirálních derivatizačních činidel v HPLC

K enantioseparaci aminokyselin a jejich derivátů se v současné době používají moderní vysokoúčinné separační techniky. Ačkoli metoda HPLC má v oblasti enantiomerní analýzy aminokyselin dominantní postavení, jiné separační metody, jako je GC⁷⁵ a CE⁷⁶ lze k tomuto účelu využít stejně efektivně. Vzhledem k tomu, že většina proteinogenních α -aminokyselin absorbuje velmi málo v UV oblasti a ani nefluoreskuje (kromě fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu)⁵⁰, je při enantioseparacích metodou HPLC dosažená citlivost detekce velmi nízká. Z tohoto důvodu je nutné aminokyseliny převést na vhodné deriváty, které jsou lépe detekovatelné UV nebo fluorescenčním detektorem. V literatuře je publikováno velké množství různých, jak chirálních derivatizačních činidel, určených pro nepřímý způsob enantioseparace, tak achirálních derivatizačních činidel, vhodných pro přímý způsob enantioseparace.^{77,78} V následující části textu bude pojednáno pouze o vybraných derivatizačních činidlech, která našla uplatnění při enantioseparacích aminokyselin v HPLC.

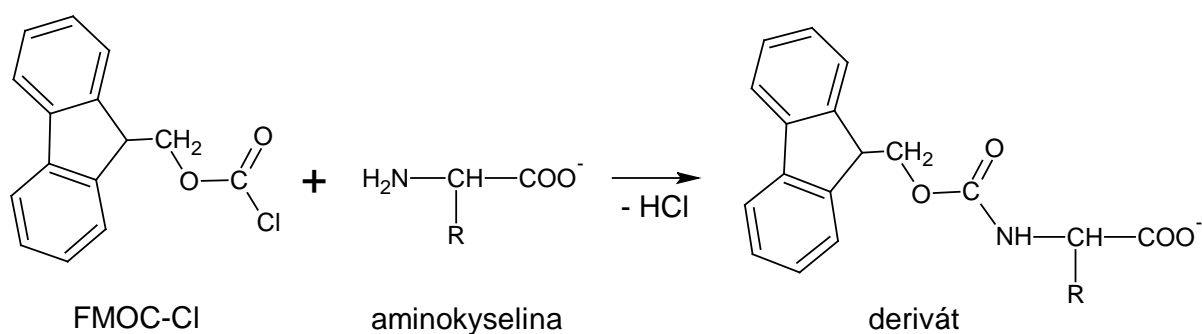
Při chirální derivatizaci aminokyselin se často využívá reakce mezi aminoskupinou aminokyseliny a *o*-ftalaldehydem (OPA) spolu s chirálními thioly.⁷⁹ Reakcí vznikají vysoce fluoreskující isoindolové deriváty, které jsou posléze separovány v běžném reverzním separačním systému. V enantioseparačním prostředí s využitím achirální C18 kolony, byly jako chirální thioly použity, např. *N*-acetyl-L-cystein (NAC) a směs methanol/fosfátový pufr, pH 6,5/tetrahydrofuran jako mobilní fáze⁶⁸ a *N*-isobutyryl-L-cystein (IBLC) s mobilní fází methanol/octanový pufr, pH 7,0 nebo 5,3 o různém objemovém zastoupení.⁸⁰ Na koloně C8 byla rovněž úspěšně použita 1-thio- β -D-galaktosa spolu s mobilní fází o složení 9/1 (v/v) methanol/0,1 M octan sodný o pH 7,6.⁸¹

Jako další chirální derivatizační činidla, která byla použita k enantiomerní analýze aminokyselin, jsou různě substituované dichlor-*s*-triaziny (DCT). Vzniklé diastereoizomery byly separovány na reverzní stacionární fázi C18 v mobilní fázi acetonitril/voda/trifluoroctová kyselina 100/900/1 nebo 800/200/1 (v/v/v) s UV detekcí při 230 nm.⁸² Široké uplatnění v rozlišení enantiomerů α -aminokyselin na běžné reverzní stacionární fázi také našlo Marfeyho činidlo (FDAA – 1-fluoro-2,4-

dinitrofenyl-5-L-alaninamid). Vzniklé diastereoizomerní páry byly separovány v binární mobilní fázi složené z acetonitrilu a vodného roztoku trifluoroctové kyseliny za použití UV detekce při 340 nm.⁸³

Jak bylo dříve popsáno, při metodě přímého chirálního dělení enantiomerů aminokyselin se využívá reakce mezi aminoskupinou aminokyseliny a achirálním derivatizačním činidlem a vzniklé deriváty jsou poté separovány na různých typech CSP. Mezi vhodná achirální činidla patří, např. různé isothiokyanáty, které reagují s aminokyselinou za vzniku derivátů thiomočoviny.⁸⁴ Jako příklad lze uvést fenylisothiokyanát (PHES), který byl použit k derivatizaci celé řady aminokyselin. Deriváty byly posléze separovány v mobilní fázi s acetonitrem jako organickým modifikátorem jak na teikoplaninové CSP⁸⁵, tak na CSP na bázi naftylethylkarbamátu- β -cyklodextrinu⁸⁶ s UV detekcí při 275 nm.

Mezi achirální derivatizační činidla, která reagují velmi rychle a snadno s primárními i sekundárními aminokyselinami, patří 9-fluorenylmethylchloromravenčan (FMOC-Cl). Reakcí, která probíhá ve vodném, slabě alkalickém prostředí (obr. 3) vznikají stabilní, vysoce fluoreskující 9-fluorenylmethylkarbamáty příslušných aminokyselin. Navázání FMOC-Cl probíhá tedy přes aminoskupinu aminokyseliny, čímž dochází k její blokaci.⁸⁷ Nevýhodou tohoto činidla je, že při derivatizaci může vznikat více interferujících vedlejších produktů v závislosti na použitém reakčním prostředí.⁸⁸ K enantioseparaci FMOC derivátů aminokyselin byly použity, např. CSP založené na derivátech celulosy i amylosy v mobilních fázích složených z 10 – 20% propan-2-olu (v) v *n*-hexanu obsahujících 0,1% trifluoroctovou kyselinu za UV detekce při 254 nm⁸⁹, dále CSP s navázaným ristocetinem A a mobilní fází methanol/0,1% triethylamoniumoctanový pufr, pH 4,1 20/80 (v/v) s UV detekcí při 254 nm.³⁶



Obr. 3 Reakce mezi FMOC-Cl a aminokyselinou

2.8 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická separační metoda založená na rozdílném rozdělování dělených látek (solutů) mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, tzv. fází mobilní (eluent) a fází stacionární (sorbent). Vlivem různých fyzikálně-chemických interakcí dochází v průběhu chromatografického procesu k dělení (separaci) analytů a vytvoření jejich jednotlivých elučních zón, které se při postupu chromatografickou kolonou rozšiřují. Vzniklé eluční zóny, resp. eluční křivky charakterizují koncentrační profil analytu. Průběh samotné separace analytů lze v kapalinové chromatografii zejména ovlivnit nejen typem stacionární fáze, ale i změnami ve složení mobilní fáze, která se oproti plynové chromatografii významně podílí na celém separačním mechanismu. Metoda HPLC našla v analytické chemii široké uplatnění, jelikož umožňuje analyzovat i velmi složité směsi látek o nízkých koncentracích.¹⁵

Mezi základní retenční veličiny, kterými lze popsat průběh separace patří **retenční faktor** k . Slouží k porovnání různých retenčních časů solutů a charakterizuje míru interakce se stacionární fází. Je dán vztahem:

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

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

Rozlišení $R_{1,2}$ charakterizuje míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Je-li hodnota $R_{1,2} \geq 1,5$ jsou píky odděleny až na základní linii. Je dáno vztahem:

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

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

Separační faktor $\alpha_{1,2}$ charakterizuje selektivitu chromatografického systému k separovaným látkám. Popisuje vzájemnou retenci dvou analytů. Je dán vztahem:

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

kde k_2 je retenční faktor později eluujícího analytu a k_1 dříve eluujícího analytu. Je-li $\alpha_{1,2} = 1$ soluty se vzájemně neseparují.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

- methanol CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acetonitril R CHROMASOLV pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- triethylamin (TEA), čistota $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- octová kyselina 99,8%, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydrogenuhličitan sodný NaHCO_3 , čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- hydroxid sodný, čistota p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- deionizovaná voda filtrovaná Milli-Q filtračním systémem (Millipore, Milford, MA, USA)
- standardy:
 - D/L-alanin (D/L-Ala), čistota $\geq 99\%$; L-alanin (L-Ala), čistota $\geq 99\%$; D-alanin (D-Ala), čistota $\geq 99\%$
 - D/L-valin (D/L-Val), čistota $\geq 99\%$; L-valin (L-Val), čistota $\geq 98\%$; D-valin (D-Val), čistota $\geq 98\%$
 - D/L-leucin (D/L-Leu), čistota $\geq 99\%$; L-leucin (L-Leu), čistota $\geq 98\%$; D-leucin (D-Leu), čistota $\geq 99\%$
 - D-isoleucin (D-Ile), čistota $\geq 98\%$; L-isoleucin (L-Ile), čistota $\geq 99,5\%$
 - 9-fluorenylmethylchloromravenčan (FMOC-Cl), čistota $\geq 99\%$

Veškeré standardy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

- vybrané charakteristické vlastnosti studovaných aminokyselin v této diplomové práci jsou uvedeny v tab. 1.⁹⁰

Tabulka 1. Vybrané vlastnosti aminokyselin alaninu, valinu, leucinu a isoleucinu. Relativní molekulová hmotnost (M_r), disociační konstanty (pK_{a1}^{25} , pK_{a2}^{25}), izoelektrický bod (pI^{25}).

Název	Molekulový vzorec	M_r	pK_{a1}^{25} (α -COOH)	pK_{a2}^{25} (α -NH ₃ ⁺)	pI^{25}
alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89,09	2,33	9,71	6,00
valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,15	2,27	9,52	5,96
leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	2,32	9,58	5,98
isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,17	2,26	9,60	6,02

3.2 Přístroje a pomůcky

Měření byla provedena na kapalinovém chromatografu, jehož součástí byly vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, UV/VIS detektor typu UV PU 4020 (Pye Unicam, Cambridge, UK), fluorescenční detektor FL 2000 (Spectra System, USA), membránový vakuový odplyňovač CSI6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK) a dávkovací kohout Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μ l. Ke sběru a zpracování dat byl použit program Clarity verze 2.8.1.584 (DataApex, Praha, ČR).

K chirální separaci byly použity tři komerčně dostupné kovové kolony obsahující chirální selektory na bázi teikoplaninu nebo teikoplanin aglykonu.

Konkrétně se jednalo o kolony:

- Chirobiotic T (ASTEC – Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm I.D., naplněnou teikoplaninem vázaným na silikagelový nosič o velikosti zrnění 5 μ m.
- Chirobiotic T2 (Supelco, Bellefonte, USA) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm I.D., naplněnou teikoplaninem vázaným na silikagelový nosič o velikosti zrnění 5 μ m. Kolona Chirobiotic T2 se od kolony Chirobiotic T liší vyšším obsahem navázaného teikoplaninového chirálního selektoru, dále zhruba dvojnásobně delším ramínkem (spacerem), které zajišťuje vazbu (spojení) mezi chirálním selektorem a silikagelem a také porozitou vlastního silikagelového nosiče.

V případě kolony Chirobiotic T dosahuje porozita silikagelu 120 Å a u kolony Chirobiotic T2 200 Å.

- Chirobiotic TAG (ASTEC - Advanced Separation Technologies, Whippany, NJ, USA) o rozměrech 250 mm x 4,6 mm, naplněnou teikoplanin aglykonem vázaným na silikagelový nosič o velikosti zrnění 5 µm.

Pevné vzorky byly navažovány na analytických vahách APX-100 (Denver Instrument, USA). Roztoky byly dávkovány skleněnou stříkačkou Hamilton (Reno, Nevada, USA) o objemu 10 µl. Hodnota pH pufrů byla nastavena pomocí pH-metru modelu 4330 (Jenway, UK)

Chromatogramy byly vyhodnoceny programem Origin 7.0 (OriginLab Corporation, USA).

3.3 Příprava vzorků a činidel

Veškeré studované aminokyseliny byly analyzovány ve formě racemátů, kromě isoleucinu. Pro jeho analýzu byly smíchány L- a D-enantiomery v poměru 1:1.

Pro separaci nederivatizovaných aminokyselin byly standardní zásobní roztoky racemátů jednotlivých aminokyselin připraveny navážením 1 mg vzorku a jeho rozpuštěním v 1 ml solventu tvořeného směsí MeOH/H₂O 50/50 (v/v). Pro studium separace a enantioseparace Fmoc derivatizovaných aminokyselin nebyla tato směs pro přípravu zásobních roztoků vhodná a byla nahrazena 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0. Standardní roztoky racemátů aminokyselin byly poté připraveny navážením 1 mg vzorku a jeho rozpuštěním v 10 ml 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0. Kalibrační roztoky použité pro měření kalibračních závislostí byly připraveny naředěním zásobních roztoků Fmoc derivátů aminokyselin hydrogenuhličitanem na požadované koncentrace.

Zásobní roztok NaHCO₃ o koncentraci 0,2 M byl připraven rozpuštěním 4,2 g v cca. 200 ml deionizované vody. Hodnota pH 9,0 byla nastavena přidáním 0,5 M NaOH, roztok byl poté doplněn do celkového objemu 250 ml.

Zásobní roztok derivatizačního činidla (Fmoc-Cl) byl připraven rozpuštěním 1 mg Fmoc-Cl v 1 ml ACN.

Takto připravené zásobní roztoky byly skladovány v temnu při teplotě 5 °C.

3.4 Mobilní fáze a podmínky měření

Pro chirální separaci nativních aminokyselin byly použity mobilní fáze složené z MeOH jako organického modifikátoru a deionizované vody v různých objemových poměrech. Detekce nederivatizovaných aminokyselin byla prováděna při vlnové délce 205 nm.

K separaci derivatizovaných FMOC-aminokyselin byly použity mobilní fáze složené z methanolu a deionizované vody nebo methanolu v kombinaci s 0,5 nebo 1,0 % vodným roztokem triethylamoniumoctanového (TEAA) pufru o pH v rozsahu 4,0 – 7,0 v různých objemových poměrech. UV detekce derivatizovaných analytů byla měřena při 262 nm a fluorescenční detekce při 254 nm pro excitaci a 314 nm pro emisi záření.

Průtoková rychlost mobilní fáze byla pro všechna měření konstantní, a to 0,7 ml/min. Analýzy probíhaly během celého experimentu za laboratorní teploty 22 ± 2 °C.

Příprava 0,5% TEAA pufru byla provedena odměřením 5 ml triethylaminu a přidáním tohoto množství do cca. 800 ml deionizované vody. Požadované pH bylo nastaveno přidávkem ledové octové kyseliny. Takto vzniklý roztok byl doplněn do celkového objemu 1 litr. Příprava 1% TEAA pufru probíhala stejným způsobem, ale odměřený objem triethylaminu byl 10 ml.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Separace nederivatizovaných aminokyselin v mobilní fázi methanol/voda

Na základě literárních údajů byla pro enantioseparaci studovaných aminokyselin v nativním stavu vybrána kolona Chirobiotic T s navázaným teikoplaninovým chirálním selektorem a pro měření byla zvolena UV detekce při 205 nm.³⁷ Analýzy probíhaly v mobilních fázích tvořených binární směsí MeOH/H₂O o různém objemovém zastoupení, ve kterých byl sledován vliv obsahu methanolu na retenci a enantioseparaci studovaných analytů. Obsah organického modifikátoru se pohyboval v rozmezí od 40 do 70 objemových procent (obj. %). V každé z testovaných mobilních fází docházelo pro racemáty všech studovaných aminokyselin k dřívější eluci L-enantiomerů před jejich D-analogy, což bylo potvrzeno standardním přídatkem jednotlivých L-aminokyselin.

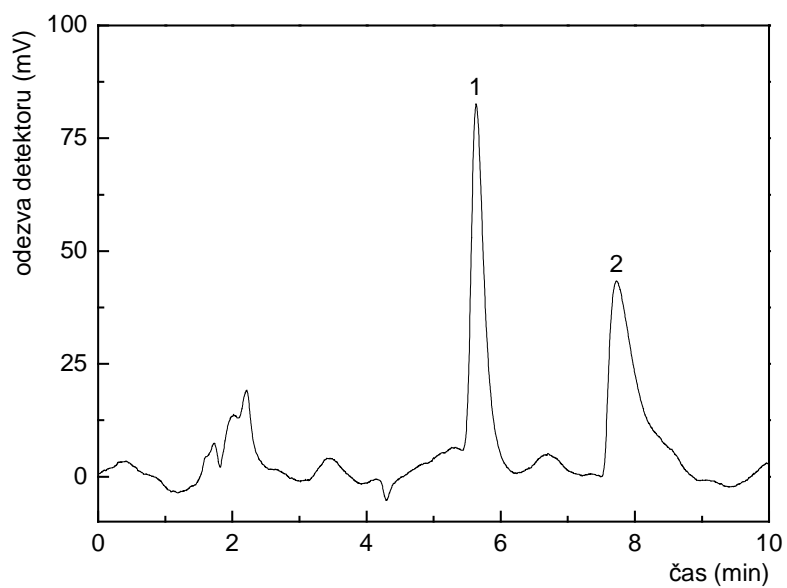
Získaná chromatografická data jsou uvedena v tab.2. Základní trend vyplývající z uvedených dat je, že s rostoucím zastoupením methanolu v mobilní fázi docházelo u všech analytů k nárůstu retenčních časů, resp. retenčních faktorů, tedy doby analýzy. V mobilní fázi s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu 40 obj. % docházelo k velmi rychlé eluci všech analytů. U D-enantiomerů se retenční časy pohybovaly okolo 6 min. V mobilní fázi s nejvyšším obsahem organického modifikátoru 70 obj. % eluovaly D-aminokyseliny do 11 min. Toto retenční chování nativních aminokyselin na teikoplaninové chirální stacionární fázi v mobilní fázi MeOH/H₂O (v/v) s vyšším obsahem methanolu (více než 50 obj. %) odpovídá tzv. HILIC (hydrofilní interakční chromatografie) módu. V tomto typu separačního systému se uplatňují především dipol-dipol interakce a vodíková vazba. Ve všech proměřovaných mobilních fázích bylo eluční pořadí L enantiomerů následující: L-Ile < L-Val < L-Leu. Průběh retenčního chování L-Ala se tomuto trendu vymykal, v mobilní fázi s 40 obj. % methanolu vykazoval nejkratší retenci ze všech L-aminokyselin a naopak v mobilní fázi s 70 obj. % methanolu vykazoval nejdelší retenční čas a eluoval jako poslední. V mobilních fázích s 40 a 50 obj. % methanolu docházelo k eluci D-enantiomerů v následujícím pořadí: D-Val < D-Ala < D-Ile < D-Leu. Se zvýšením obsahu methanolu v mobilní fázi

na 60 obj. % a výše došlo opět k podstatnému prodloužení retence D-Ala a D-enantiomery eluovaly v pořadí: D-Val < D-Ile < D-Leu < D-Ala.

Rostoucí retence měla pro racemáty sledovaných aminokyselin stereoselektivní charakter a byla doprovázena vzrůstající hodnotou enantiorozlišení a stoupající enantioselektivitou, s výjimkou mobilní fáze s 60 obj. % methanolu, ve které nastal pokles v enantiorozlišení u všech analytů. V každé z testovaných mobilních fází došlo k rozdělení L- a D-enantiomerů až na základní linii. Z hodnot enantiorozlišení lze vysledovat, že v každé z proměřovaných mobilních fází se nejlépe separoval D/L-Ile a nejhůře D/L-Val. V mobilní fázi s nejnižším zastoupením methanolu probíhaly enantioseparace aminokyselin s poměrně vysokými hodnotami rozlišení i přes krátkou retenci, nepřesahující pro žádnou aminokyselinu 8 min. V mobilní fázi s nejvyšším proměřovaným obsahem methanolu bylo dosaženo nejvyšších hodnot enantiorozlišení např. u D/L-Ile ($R = 6,87$) a u nejrychlejšího D/L-Val ($R = 3,46$).

Jelikož v této práci studované nativní aminokyseliny obsahují pouze karboxylovou skupinu jako chromofor, musela být pro jejich UV detekci zvolena nízká vlnová délka 205 nm, aby bylo dosaženo vyšší citlivosti UV detekce. Nevýhodou měření při nízkých vlnových délkách je však zhoršený průběh základní linie, způsobený absorpcí záření i ostatními složkami mobilní fáze. Pro ilustraci je na obr. 4 uvedena enantioseparace D/L-Leu v mobilní fázi MeOH/H₂O 50/50 (v/v).

Nízkou citlivost UV detekce nativních aminokyselin i při 205 nm potvrzují poměrně vysoké hodnoty LOD a LOQ získané při kvantifikaci L- a D-enantiomerů valinu v mobilní fázi tvořené MeOH/H₂O 50/50 (v/v), pohybující se řádově v jednotkách, respektive desítkách $\mu\text{g/ml}$.⁹¹



Obr. 4 Enantioseparace D/L-Leu, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/H₂O 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 205 nm, označení: 1: L-Leu, 2: D-Leu.

Tabulka 2. Vliv obsahu methanolu na hodnoty retenčního faktoru (k_1) L-enantiomeru, (k_2) D-enantiomeru, enantiozlišení ($R_{1,2}$) a enantioselektivity ($\alpha_{1,2}$) studovaných racemátů aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 205 nm.

Aminokyselina	MeOH/H ₂ O, (v/v)															
	40/60				50/50				60/40				70/30			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
Ala	1,22	1,67	2,57	1,37	1,47	2,20	3,42	1,50	1,68	2,70	2,82	1,61	2,06	3,56	3,84	1,73
Val	1,27	1,57	1,92	1,24	1,41	1,89	2,63	1,34	1,53	2,20	2,28	1,44	1,73	2,69	3,46	1,55
Leu	1,40	2,08	3,25	1,49	1,50	2,43	3,94	1,62	1,60	2,68	3,53	1,68	1,73	3,15	4,25	1,82
Ile	1,26	2,00	3,38	1,59	1,29	2,22	4,40	1,72	1,51	2,55	3,69	1,69	1,62	3,02	6,87	1,86

4.2 Derivatizace studovaných aminokyselin

Protože studované aminokyseliny v nativní podobě nevykazují v UV oblasti dostatečnou absorpci a díky absenci fluoroforu v molekule také žádnou fluorescenci, je pro zvýšení jejich citlivosti detekce v HPLC nutná derivatizace. Z velkého množství derivatizačních činidel byl pro derivatizaci sledovaných aminokyselin vybrán 9-fluorenylmethylchloromravenčan (FMOC-Cl). Toto achirální činidlo umožňuje po derivatizační reakci použít stejný separační systém jako při separaci nativních aminokyselin. Reakce uskutečňující se přes aminoskupinu aminokyseliny za vzniku stabilní amidové vazby probíhá rychle i za laboratorní teploty, vzniklé deriváty vykazují fluorescenci a zvyšují i citlivost detekce v UV oblasti.³⁶ Na základě literatury⁸⁸ byl vybrán pro derivatizační reakci dostatečný nadbytek derivatizačního činidla vůči aminokyselině i vhodná vlnová délka 262 nm pro UV detekci. Derivatizační reakce byla pro každou aminokyselinu provedena smísením zásobního roztoku aminokyseliny (200 µg/ml MeOH/H₂O 50/50 (v/v)) se zásobním roztokem FMOC-Cl (200 µg/ml v ACN) v poměru 1/4 (v/v), následně byla směs intenzivně protřepána a ponechána v klidu při laboratorní teplotě po dobu 20 min.

Pro takto derivatizované aminokyseliny byl na koloně Chirobiotic T hledán s využitím UV detekce vhodný separační systém pro sledování optimalizace derivatizačního postupu.

4.3 Separace FMOC-aminokyselin v mobilní fázi methanol/voda s UV detekcí

Jak bylo popsáno výše, pro separaci derivatizovaných aminokyselin byla nejprve zvolena UV detekce při vlnové délce 262 nm a opět mobilní fáze MeOH/H₂O (v/v). Byl sledován vliv různého obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi v rozmezí 30 – 70 obj. % na retenci a enantioseparaci FMOC derivátů aminokyselin. Získaná chromatografická data jsou uvedena v tab. 3. Z té je patrné, že s rostoucím zastoupením vodné složky v mobilní fázi docházelo k nepatrnému nárůstu retence u všech FMOC derivátů aminokyselin, s výjimkou FMOC-D/L-Val, jehož retenční čas se prakticky neměnil. U žádného FMOC derivátu aminokyseliny nedošlo v proměřovaných

mobilních fází ani k náznaku enantioseparace a retenční časy byly velmi krátké, téměř totožné s mrtvým časem kolony. Různý obsah methanolu v mobilní fázi neměl tudíž žádný vliv na rozlišení a selektivitu derivatizovaných enantiomerů aminokyselin.

Tabulka 3. Vliv různého obsahu methanolu v mobilní fázi na retenci a separaci FMOC derivátů D/L-aminokyselin, označení stejné jako v tab. 2. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze methanol/voda v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 262 nm.

FMOC-D/L- aminokyselina	MeOH/H ₂ O, (v/v)								
	70/30			50/50			30/70		
	<i>k</i> ₁	<i>R</i> _{1,2}	<i>α</i> _{1,2}	<i>k</i> ₁	<i>R</i> _{1,2}	<i>α</i> _{1,2}	<i>k</i> ₁	<i>R</i> _{1,2}	<i>α</i> _{1,2}
Ala	0,05	–	–	0,06	–	–	0,08	–	–
Val	0,03	–	–	0,04	–	–	0,03	–	–
Leu	0,02	–	–	0,06	–	–	0,07	–	–
Ile	0,01	–	–	0,05	–	–	0,08	–	–

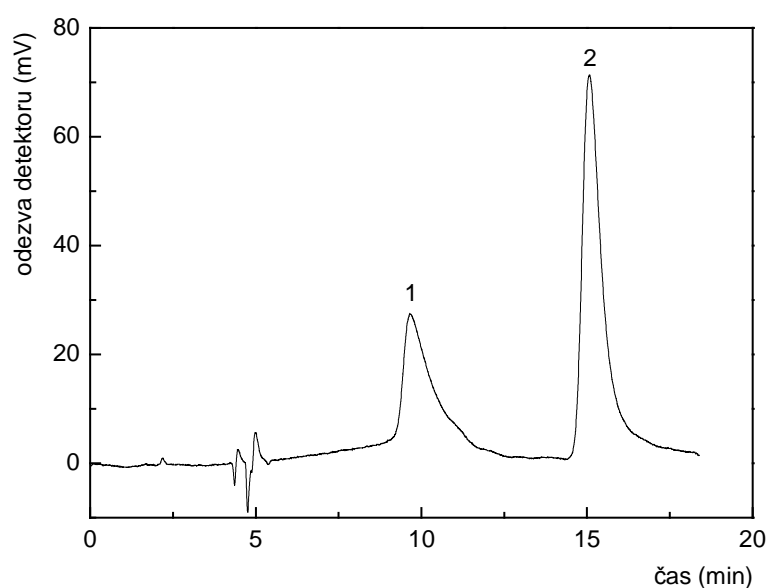
–, analyt nepodléhal ani částečné enantioseparaci

Na obr. 5 je zaznamenán průběh separace samotného derivatizačního činidla (FMOC-Cl) v mobilní fázi MeOH/H₂O 30/70 (v/v). Z chromatogramu je patrné, že derivatizační činidlo vykazovalo delší retenci než derivatizované aminokyseliny a poskytovalo dva dobře odlišitelné píky. První pík je pravděpodobně produktem hydrolyzy derivatizačního činidla na 9-fluorenylmethoxykarboxylovou kyselinu (FMOC-OH), přičemž druhý větší pík je pravděpodobně produkt následné dekarboxylace FMOC-OH 9-fluorenylmethanol (FM-OH), jak bylo popsáno v literatuře.⁹²

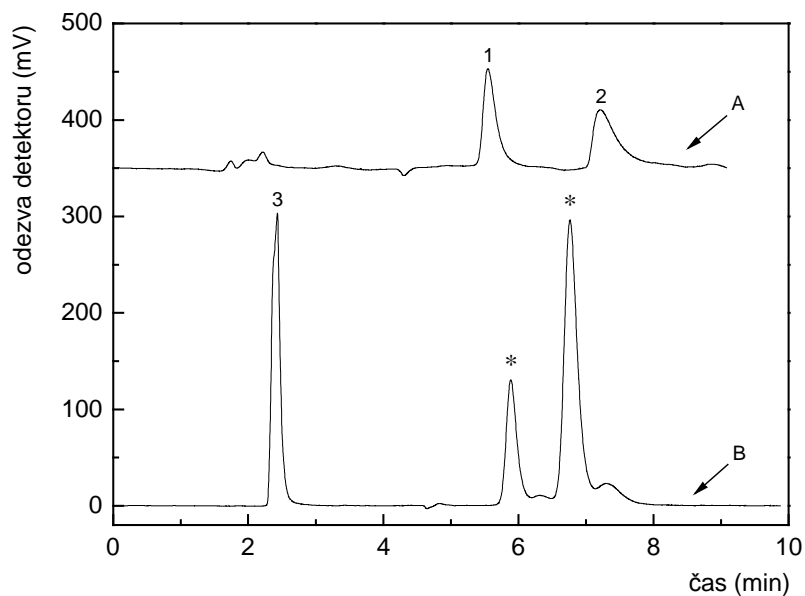
Z porovnání chromatografických dat (tab. 2 vs. tab. 3) sumarizující retenční a enantioseparační chování nativních a FMOC derivatizovaných aminokyselin ve vodně-methanolických mobilních fázích je patrné, že interakce aminoskupiny přítomné v molekule aminokyseliny s teikoplaninem je velmi důležitá nejen z hlediska enantioseparace, ale i samotné retence. Enantiomery nederivatizovaných aminokyselin podléhaly v každé proměřované mobilní fázi separaci až na základní linii, zatímco u derivatizovaných aminokyselin s blokovanou aminoskupinou tomu tak nebylo a nedošlo

ani k částečné separaci enantiomerů. Pro znázornění je na obr.6 zaznamenán průběh enantioseparace nederivatizovaného D/L-Ala a derivatizovaného FMOC-D/L-Ala v mobilní fázi MeOH/H₂O 50/50 (v/v).

V stereoselektivním interakčním mechanismu jsou důležité interakce mezi chirálním selektorem a aminoskupinou aminokyseliny, které se po zablokování aminoskupiny nemohou projevit. Obdobné chování bylo již pozorováno pro *N-terc.*-butyloxykarbonyl blokované aminokyseliny.³⁸ Ke změně enantiosektivity bylo proto nutné optimalizovat složení mobilní fáze a změnit typ vodné složky.



Obr. 5 Separace FMOC-Cl, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/H₂O 30/70 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce 262 nm, označení: 1: pravděpodobně FMOC-OH, 2: pravděpodobně FM-OH.



Obr. 6 Enantioseparace **A)** D/L-Ala **B)** Fmoc-D/L-Ala, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/H₂O 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, UV detekce **A)** 205 nm **B)** 262 nm, označení: 1: L-Ala, 2: D-Ala, 3: Fmoc-D/L-Ala, *: derivatizační činidlo.

4.4 Sledování vhodných derivatizačních podmínek v pufované mobilní fázi pomocí UV detekce

Pro podpoření vhodných interakcí mezi analytem a chirální stacionární fází byla vodná složka mobilní fáze zaměněna za vodný roztok triethylamoniumoctanového (TEAA) pufru. Při chirálních separacích s využitím glykopeptidových chirálních selektorů byl velmi často pro nastavení požadované hodnoty pH vodné složky mobilní fáze používán TEAA pufr o koncentraci v rozmezí 0,1 – 1% vodný roztok.²⁰

K hledání vhodných podmínek pro derivatizaci byl zvolen reverzní separační mód a binární mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr o různé hodnotě pH a v různém objemovém poměru methanol/pufr. Postupně byly proměřeny mobilní fáze o pH TEAA pufru 4,0; 5,0 a 6,0 a obsah organického modifikátoru se pohyboval v rozmezí 30 – 50 obj. %. Byl sledován jak vliv pH vodného roztoku pufru, tak i vliv obsahu organického modifikátoru na retenční a enantioseparační chování studovaných derivátů aminokyselin.

V každé z testovaných mobilních fází eluovaly FMOC-L-enantiomery aminokyselin před jejich FMOC-D-analogy, což bylo potvrzeno standardním přidavkem jednotlivých FMOC derivátů D-enantiomerů. Ze získaných údajů bylo patrné, že záměna vody za pufr v korespondujících mobilních fázích vedla k prodloužení retence u všech FMOC derivátů. To však v některých případech vedlo k částečné nebo úplné koeluci s píky derivatizačního činidla. Na enantiozřízení měla záměna vody za pufr výrazný vliv. U všech analytů dosahovalo rozlišení mezi enantiomery vysokých hodnot, ale díky již zmíněné koeluci nešlo u některých enantioseparací určit.

Ze získaných chromatografických dat vyplynulo to, že jako nejvhodnější mobilní fáze pro sledování průběhu derivatizace všech čtyřech racemátů aminokyselin byla mobilní fáze 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr o pH 6,0, jelikož se retence pohybovala v přijatelném čase do 18 min a FMOC-enantiomery jednotlivých aminokyselin byly odseparované od obou píků derivatizačního činidla.

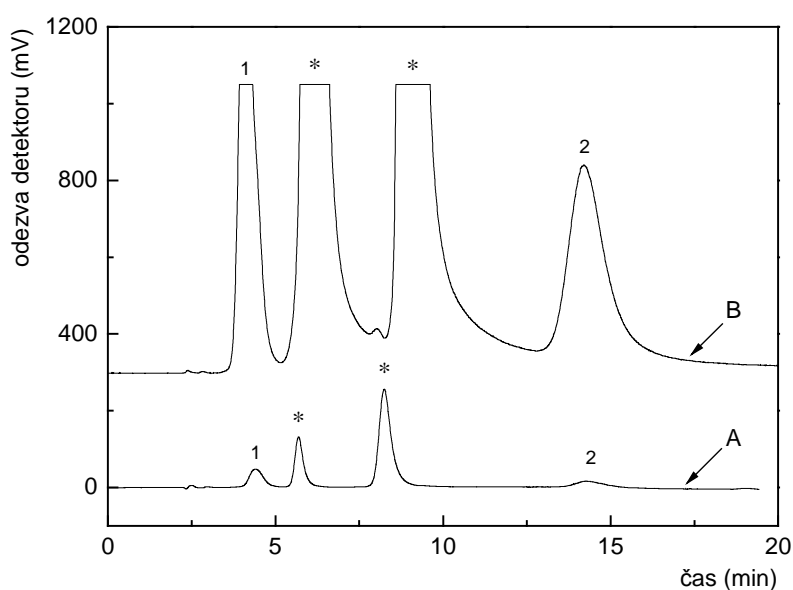
Podrobný vliv hodnoty pH pufru v mobilní fázi na separaci byl sledován později s citlivější fluorescenční detekcí, která poskytovala retenční data velmi podobná datům získaným při UV detekci. Z tohoto důvodu zde není uvedena tabulka s konkrétními daty z UV detekce. Ta byla použita pouze k hledání vhodných podmínek pro fluorescenční detekci. Detailnější popis retenčního a enantioseparačního chování FMOC derivátů aminokyselin v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr o různé hodnotě pH a v různém objemovém poměru methanol/pufr s využitím fluorescenční detekce je uveden v další části této práce.

4.5 Optimalizace průběhu derivatizace s fluorescenční detekcí

Vlastní průběh derivatizace studovaných racemátů aminokyselin byl tedy sledován ve zvolené mobilní fázi 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA, pH 6,0 již s využitím fluorescenční detekce. Optimální vlnové délky pro excitaci ($\lambda_{Ex} = 254 \text{ nm}$) a emisi ($\lambda_{Em} = 314 \text{ nm}$) záření byly vybrány na základě excitačních a emisních spekter FMOC-aminokyselin podle literatury.⁸⁸

Po nadávkování stejného množství FMOC-D/L-aminokyselin jako při UV detekci bylo dosaženo mnohonásobně vyšší citlivosti detekce. Pro znázornění je na obr. 7 zaznamenán průběh separace FMOC-D/L-Ala v optimalizované mobilní fázi za UV a

fluorescenční detekce. Z chromatogramu je patrné, že FMOC-L-Ala poskytoval signál nad rozsah detekce, derivatizační činidlo v nadbytku dva široké píky a FMOC-D-Ala taktéž velmi široký a intenzivní pík. Pro následné separace bylo proto nutné při derivatizaci analytů vhodně zvolit koncentraci aminokyseliny poskytující píky o přiměřené intenzitě a koncentraci derivatizačního činidla, která by poskytovala užší píky.

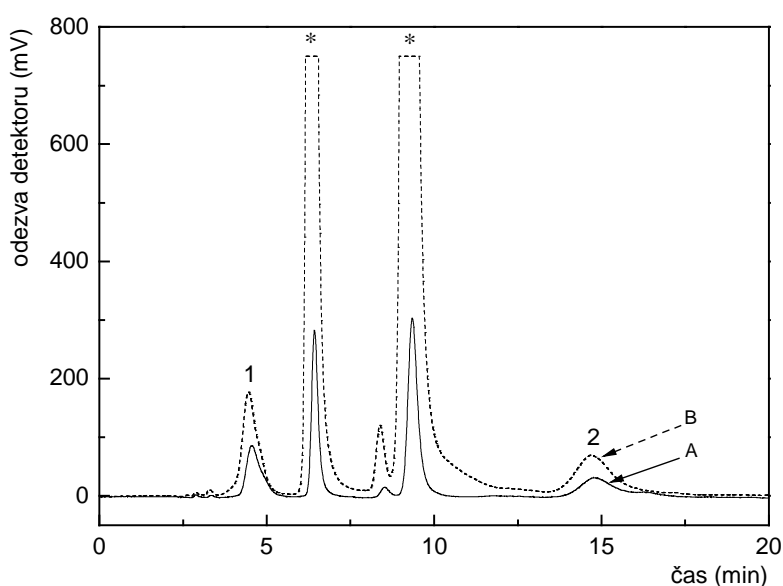


Obr. 7 Porovnání citlivosti UV a fluorescenční detekce při enantioseparaci FMOC-D/L-Ala, **A)** UV detekce 262 nm **B)** fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Ala, 2: FMOC-D-Ala, *: derivatizační činidlo; kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min,

K volbě vhodné koncentrace aminokyseliny a derivatizačního činidla ve směsi byl vybrán pouze jeden analyt a to D/L-Ala, jelikož jeho FMOC-enantiomery byly dostatečně vzdálené od obou píků derivatizačního činidla a retence FMOC-D-Ala nepřesahovala 16 min.

Standardní zásobní roztok D/L-Ala byl zředěn na koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$. Zásobní roztok FMOC-Cl byl zředěn na koncentraci 2 a 20 $\mu\text{g/ml}$. Při takto zvolených koncentracích byla provedena stejným, již dříve popsaným postupem derivatizace.

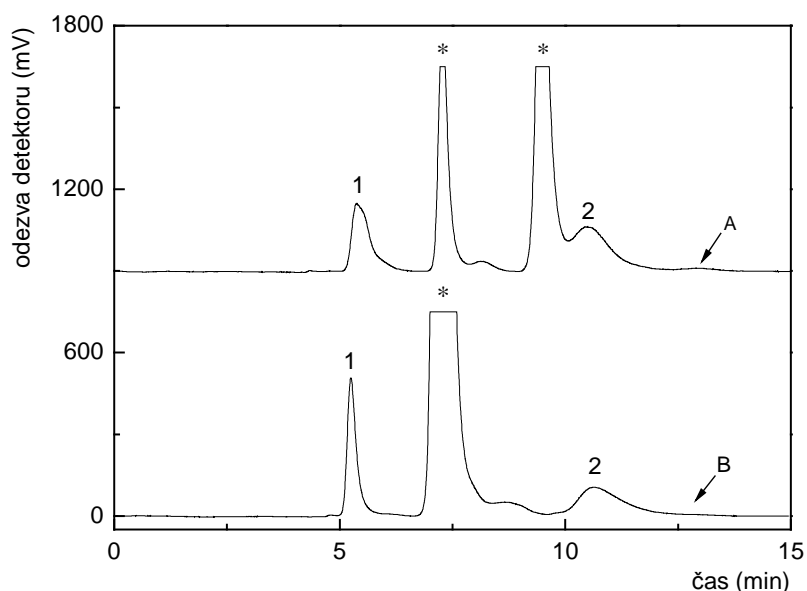
Záznam obou separací je dokumentován na obr. 8. Z chromatogramu vyplývá, že vyšší účinnosti derivatizace (větší intenzity píků FMOC-enantiomerů alaninu) bylo dosaženo při derivatizaci aminokyseliny o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ s FMOC-Cl o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ při smíchání v objemovém poměru 1:1. Takto zvolené koncentrace standardních zásobních roztoků pro derivatizaci byly vybrány jako kompromis mezi dostatečnou odezvou analytu a šířkou píků derivatizačního činidla.



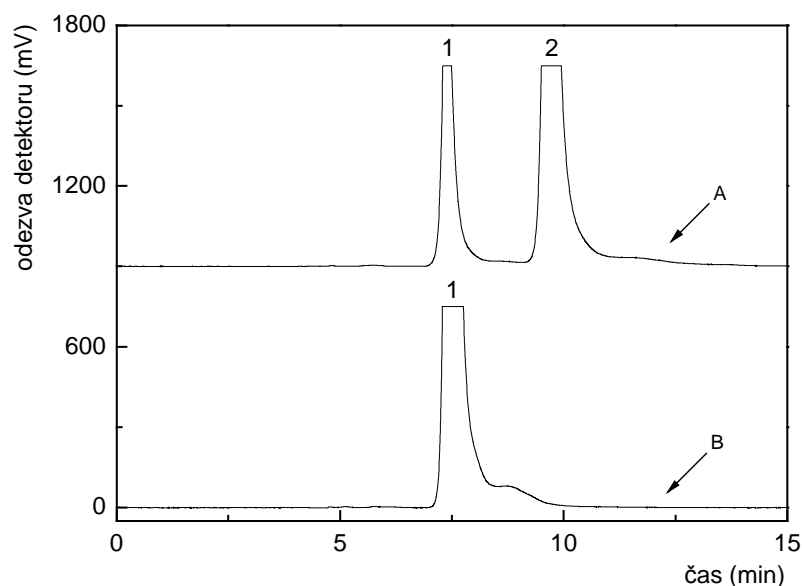
Obr. 8 Derivatizace D/L-Ala ($c_{\text{D/L-Ala}} = 2 \mu\text{g/ml}$) pomocí FMOC-Cl o různé koncentraci, **A**) $c_{\text{FMOC-Cl}} = 2 \mu\text{g/ml}$ **B**) $c_{\text{FMOC-Cl}} = 20 \mu\text{g/ml}$, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), kolona Chirobiotic T, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Ala, 2: FMOC-D-Ala, *: derivatizační činidlo.

Z dosud získaných výsledků je tedy zřejmé, že nezreagované derivatizační činidlo poskytovalo dva širší píky o vysokých intenzitách. Jelikož FMOC-D-Val byl ze všech FMOC-D-enantiomerů aminokyselin ve zvoleném separačním systému nejméně zadržován, docházelo k jeho částečné koeluci s druhým píkem derivatizačního činidla. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen jiný typ rozpouštědla racemátů aminokyselin. Doposud používaná směs MeOH/H₂O 50/50 (v/v) byla nahrazena 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0 pro potlačení nežádoucí možné dekarboxylace FMOC-OH. Záznamy průběhů separací

FMOC-D/L-Val, který byl před vlastní derivatizací nejprve rozpuštěn v MeOH/H₂O 50/50 (v/v) a posléze v 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0, jsou uvedeny na obr. 9. Z chromatogramu je patrné, že po změně typu solventu analytu derivatizační činidlo poskytovalo pouze již jeden intenzivní pík a FMOC-D-Val byl od toho píku zcela odseparovaný. Po zjištění této skutečnosti byly pro ověření provedeny separace pouze FMOC-Cl zředěného v MeOH/H₂O 50/50 (v/v) a následně v 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0 (obr. 10), čímž bylo potvrzeno to, že FMOC-Cl poskytoval v hydrogenuhličitanu pouze jeden pík. S ohledem na požadované vzájemné odseparování FMOC derivátů D-aminokyselin ve směsi bylo přistoupeno k záměně rozpouštědla u všech studovaných racemátů aminokyselin.



Obr. 9 Porovnání průběhu derivatizace v nepufrovaném a pufrovaném roztoku pro enantioseparaci FMOC-D/L-Val, **A**) D/L-Val rozpuštěn v MeOH/H₂O 50/50 (v/v) **B**) D/L-Val rozpuštěn v 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0; kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Val, 2: FMOC-D-Val, *: derivatizační činidlo.



Obr. 10 Separace FMOC-Cl za použití různých ředících roztoků, **A)** FMOC-Cl zředěn MeOH/H₂O 50/50 (v/v) **B)** FMOC-Cl zředěn 0,2 M NaHCO₃ o pH 9,0; kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: pravděpodobně FMOC-OH, 2: pravděpodobně FM-OH.

V dalším kroku optimalizace derivatizace byly v reakční směsi při již vhodně zvolených koncentracích standardních zásobních roztoků aminokyselin (2 µg/ml) a FMOC-Cl (20 µg/ml) zkoušeny různé objemové poměry D/L-aminokyselina/FMOC-Cl. Po smísení byly roztoky intenzivně protřepány a ponechány v klidu po dobu 20 min při laboratorní teplotě. Derivatizační reakce byly postupně provedeny tak, aby FMOC-Cl vůči aminokyselině dosahoval 5 – 40 násobného koncentračního nadbytku. Získané výsledky, které jsou sumarizovány v tab. 4 ukazují ovlivnění plochy píků FMOC-D/L-enantiomerů aminokyselin různým obsahem derivatizačního činidla v reakční směsi. Ze zaznamenaných kvantifikačních parametrů vyplývá, že při desetinásobném koncentračním nadbytku FMOC-Cl vůči aminokyselině (objemový poměr 1/1) dosahovaly plochy všech FMOC-D/L-enantiomerů maximálních hodnot.

Tabulka 4. Vliv obsahu FMOC-Cl v derivatizační reakci na hodnoty plochy píků FMOC-L-enantiomerů (A_1) a FMOC-D-enantiomerů (A_2) studovaných aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0; D/L-aminokyselina o koncentraci ($c_{D/L-amk.} = 2 \mu\text{g/ml}$)/FMOC-Cl o koncentraci ($c_{FMOC-Cl} = 20 \mu\text{g/ml}$) v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, $n = 3$.

$c_{D/L-amk.}/c_{FMOC-Cl}$ (v/v)	FMOC-D/L-aminokyselina							
	Ala		Val		Leu		Ile	
	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2	A_1	A_2
	mV·s	mV·s	mV·s	mV·s	mV·s	mV·s	mV·s	mV·s
1/4	6796	5828	4237	2997	3823	3294	4143	2325
1/2	9521	8933	5852	4434	5699	5180	6964	3574
1/1	12700	12087	8615	7372	7862	7103	9532	5469
1/0,5	9501	8954	7961	6724	7453	6665	8707	4403

Dále lze vypořádat vliv různého obsahu FMOC-Cl na výtěžnost derivatizační reakce. Jelikož při separacích nebyl k dispozici normalizovaný standard derivatizované aminokyseliny, byly jako výchozí body pro sledování výtěžnosti derivatizace vybrány FMOC-D-enantiomery při desetinásobném koncentračním nadbytku (1/1 v/v) FMOC-Cl. Při zohlednění jednotlivých ředění vychází, že se stoupajícím nadbytkem derivatizačního činidla (objemové poměry 1/2 a 1/4) stoupá výtěžnost derivatizační reakce. V případě objemového poměru 1/0,5 dochází k výraznému poklesu ve výtěžnosti.

Z dosažených výsledků je vidět, že čím větší je nadbytek derivatizačního činidla v reakční směsi, tím se rovnováha posouvá ve prospěch produktů. Rostoucí obsah FMOC-Cl při derivatizaci měl sice za následek vyšší výtěžnost derivatizace, ale zároveň docházelo i k nezanedbatelnému nárůstu šířky jeho píku v chromatogramech, což snižovalo separační účinnost ve smyslu neúplné separace FMOC-enantiomerů od derivatizačního činidla. Z této skutečnosti lze usuzovat, že výrazně limitujícím krokem v průběhu derivatizační reakce je vhodná volba množství derivatizačního činidla. Pro následné derivatizační reakce byl zvolen jako optimální objemový poměr 1/1 D/L-aminokyselina/FMOC-Cl, kdy koncentrace derivatizačního činidla byla vůči

koncentraci aminokyseliny desetkrát vyšší. Takto zvolený objemový poměr byl opět vybrán jako kompromis mezi dostatečnou odezvou analytů a šířkou píku derivatizačního činidla.

4.6 Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin na koloně Chirobiotic T za vybraných podmínek derivatizace v pufované mobilní fázi s fluorescenční detekcí

Pro studium retenčního a enantioseparačního chování FMOC-D/L-enantiomerů aminokyselin byla zvolena binární mobilní fáze tvořená směsí MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a v různém objemovém zastoupení methanol/pufr. Byly hledány optimální podmínky pro enantioseparaci studovaných FMOC-D/L-aminokyselin s cílem vzájemné separace derivátů D-aminokyselin ve směsi až na základní linii, jelikož D-aminokyseliny jsou minoritní složkou v reálných vzorcích. Volba vhodného složení mobilní fáze byla hledána s ohledem na to, aby při separacích analytů byly jednotlivé deriváty enantiomerů zcela odseparovány od píku derivatizačního činidla a rozlišení mezi FMOC-D/L-enantiomery dosahovalo přijatelné hodnoty.

Na základě provedené optimalizace derivatizace byl připraven derivatizovaný standard každé aminokyseliny o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$, tím způsobem, že byl smíchán zásobní roztok dané D/L-aminokyseliny o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$ s zásobním roztokem FMOC-Cl o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$ v poměru 1/1 (v/v).

Získaná chromatografická data, která jsou sumarizována v tab. 5, popisují ovlivnění retenčního a enantioseparačního chování FMOC derivátů aminokyselin různým obsahem methanolu a různým pH pufru v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr (v/v). Postupně byly proměřeny mobilní fáze s obsahem organického modifikátoru 50 a 40 obj. %. Byly vyzkoušeny i mobilní fáze s 30% obsahem methanolu, ale vzhledem k dlouhým retencím a nízké separační účinnosti bylo od tohoto obsahu organického modifikátoru odstoupeno. Hodnota pH vodné složky mobilní fáze se při daných obsazích methanolu pohybovala v rozsahu 4,0 – 6,5.

Při separacích docházelo k částečné nebo dokonce k úplné koeluci FMOC-L- či FMOC-D-enantiomerů aminokyselin s píkem derivatizačního činidla (v tabulce označen

jako FMOC-OH). Z tohoto důvodu nebylo možné u mnoha separací určit enantiorozlišení. Různé případy koeluce jsou v tab. 5 symbolizovány písmeny *a – e*. Pro ilustraci jsou pod stejným označením na obr. 11 zaznamenány průběhy enantioseparací pouze pro FMOC-D/L-Val v mobilních fázích MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a různém obsahu MeOH. Na obr. 11 *a*) je zaznamenána úplná koeluce FMOC-L-Val s derivatizačním činidlem, na obr. 11 *b*) částečná koeluce FMOC-L-Val z levé strany píku derivatizačního činidla, přičemž částečná koeluce FMOC-L-Val z pravé strany je znázorněna na obr. 11 *c*). Úplná koeluce FMOC-D-Val s derivatizačním činidlem je uvedena na obr. 11 *d*) a částečná koeluce FMOC-D-Val z pravé strany píku derivatizačního činidla je zaznamenána na obr. 11 *e*).

Enantiosektivita analytů byla v případech částečné koeluce jednoho z FMOC-enantiomerů (data označená písmeny *b, c, e*) vypočtena z retenčních faktorů příslušných FMOC-D/L-enantiomerů, přičemž při úplné koeluci jednoho z FMOC-enantiomerů (data označená písmeny *a, d*) byla vypočtena z retenčního faktoru píku derivatizačního činidla a retenčního faktoru FMOC-enantiomeru příslušné aminokyseliny.

Tabulka 5. Vliv různého obsahu methanolu a hodnoty pH 0,5% TEAA pufru v mobilní fázi na retenci a separaci FMOC derivátů D/L-aminokyselin, označení stejné jako v tabulce 2. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm.

FMOC-D/L-aminokyselina								
Ala								
MeOH/0,5% TEAA pufr, (v/v)								
pH pufru	50/50				40/60			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
4,0	1,57 ^a	3,06	x ^f	1,95	2,42 ^c	4,83	x ^f	2,00
4,5	1,32 ^b	2,69	x ^f	2,04	2,14 ^a	6,09	x ^f	2,85
5,0	1,26 ^b	3,38	x ^f	2,68	2,16 ^a	6,68	x ^f	3,09
5,5	1,14	2,95	8,62	2,59	1,96 ^b	6,25	x ^f	3,19
6,0	0,98	2,57	7,09	2,62	1,47	4,66	7,28	3,17
6,5	0,93	2,21 ^e	x ^f	2,38	1,47	4,22	6,56	2,87
Val								
4,0	1,50 ^a	2,20	x ^f	1,47	2,43 ^c	4,00	x ^f	1,65
4,5	1,23 ^b	2,20	x ^f	1,79	2,17 ^a	5,07	x ^f	2,34
5,0	1,14 ^b	2,61	x ^f	2,29	1,87 ^b	5,22	x ^f	2,79
5,5	1,06	2,21 ^e	x ^f	2,08	1,67 ^b	4,69	x ^f	2,81
6,0	0,98	1,99 ^e	x ^f	2,03	1,28	3,49	5,02	2,73
6,5	0,89	1,50 ^d	x ^f	1,69	1,23	3,06 ^e	x ^f	2,49
Leu								
4,0	1,50 ^a	2,94	x ^f	1,96	2,65 ^c	5,58	x ^f	2,11
4,5	1,24 ^b	2,74	x ^f	2,21	2,49 ^c	7,55	x ^f	3,03
5,0	1,16 ^b	3,32	x ^f	2,86	2,11 ^a	8,65	x ^f	4,10
5,5	1,08	3,05	10,60	2,82	1,98 ^b	8,22	x ^f	4,15
6,0	0,99	2,79	6,83	2,82	1,48	5,86	7,17	3,96
6,5	0,93	2,46 ^e	x ^f	2,65	1,32	5,19	7,06	3,93
Ile								
4,0	1,53 ^a	2,81	x ^f	1,84	2,81 ^c	5,38	x ^f	1,91
4,5	1,29 ^b	2,58	x ^f	2,00	2,48 ^c	6,78	x ^f	2,73
5,0	1,12 ^b	2,91	x ^f	2,60	2,15 ^a	7,60	x ^f	3,53
5,5	1,06	2,79	6,35	2,63	1,90 ^b	6,92	x ^f	3,64
6,0	0,97	2,42 ^e	x ^f	2,49	1,39	5,24	6,84	3,77
6,5	0,93	2,22 ^e	x ^f	2,39	1,31	4,45	5,76	3,40

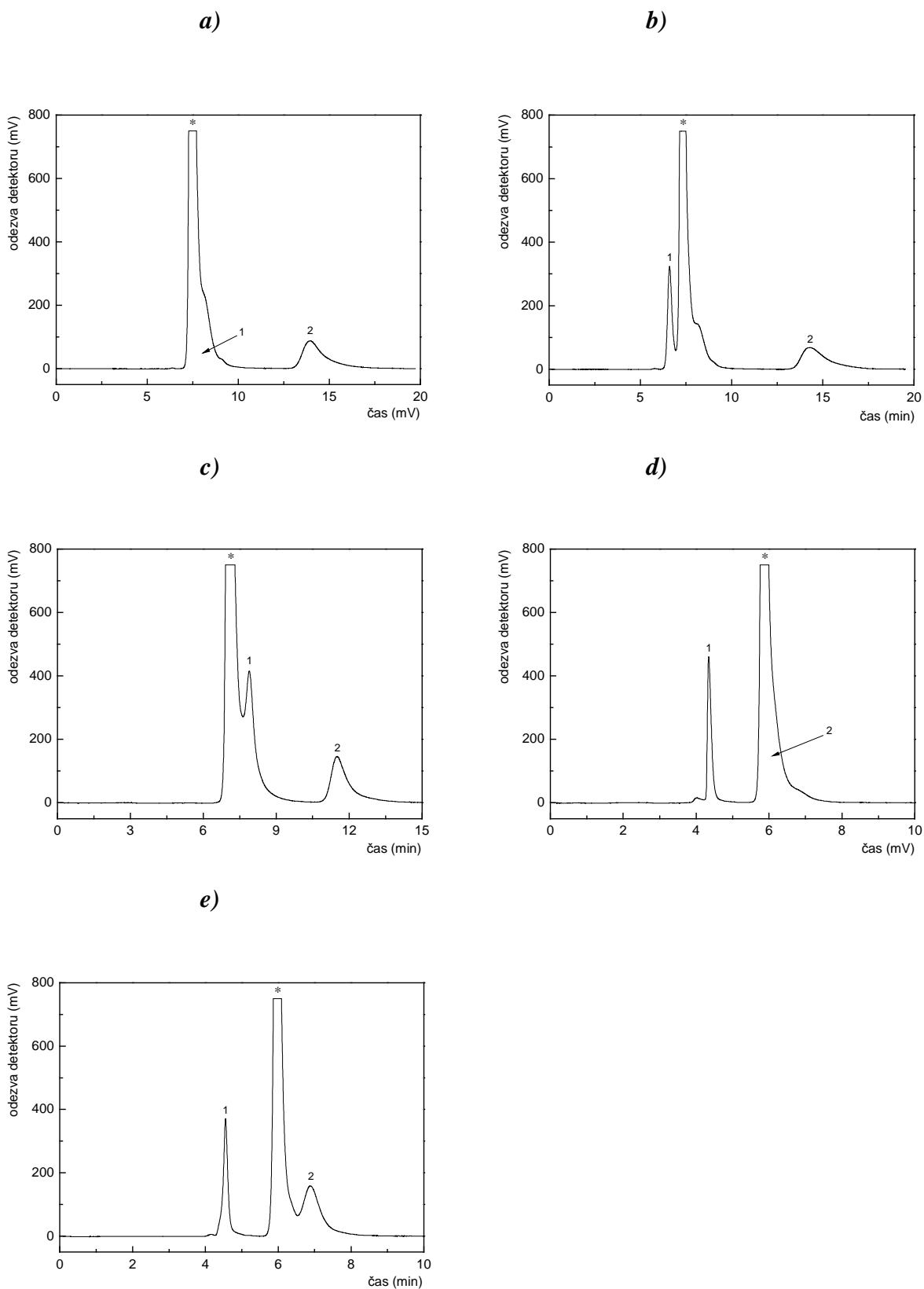
^a úplná koeluce FMOC-L-enantiomeru s FMOC-OH

^{b,c} částečná koeluce FMOC-L-enantiomeru s FMOC-OH

^d úplná koeluce FMOC-D-enantiomeru s FMOC-OH

^e částečná koeluce FMOC-D-enantiomeru s FMOC-OH

^f enantiorozlišení nelze určit



Obr. 11: Enantioseparace Fmoc-D/L-Val v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a v různém objemovém zastoupení methanol/pufr, **a)** MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 4,5 40/60 (v/v) **b)** MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 5,0 40/60 (v/v) **c)** MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 4,0 40/60 (v/v) **d)** MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,5 50/50 (v/v) **e)** MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 50/50 (v/v), označení: 1: Fmoc-L-Val, 2: Fmoc-D-Val, *: derivatizační činidlo.

Z tabulky 5 je patrné, že snížení obsahu methanolu v mobilní fázi z 50 na 40 obj. % vyvolalo zvýšení retence obou derivatizovaných enantiomerů, a to ve všech proměřovaných mobilních fázích. S delší dobou, kterou analyty strávily v separačním prostředí, docházelo k stereoselektivním interakcím s chirálním selektorem, což mělo za následek nárůst hodnoty enantiorozlišení a enantioselektivity doprovázený zlepšující se symetrií obou píků. V mobilních fázích o určité hodnotě pH TEAA pufru vyvolal však u některých separací pokles obsahu methanolu částečnou nebo úplnou koeluci analytů s derivatizačním činidlem, jindy naopak zapříčinil odseparování obou enantiomerů od derivatizačního činidla.

Prodloužení retence v důsledku rostoucího zastoupení vodné složky v mobilní fázi bylo při pH TEAA pufru 4,0; 5,0 a 6,0 nejlépe patrné u FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Ile. V mobilní fázi, např. o pH vodné složky 6,0, vyvolal pokles obsahu methanolu z 50 na 40 obj. % největší nárůst retenčního času přibližně o 7 min u FMOC-D-Leu. Naopak nejmenší prodloužení retence bylo pozorováno u FMOC-D-Val u kterého vzrostl retenční čas přibližně o 3 min.

Zatímco zvýšení obsahu vodné složky v mobilních fázích vykazovalo jednotný trend, vliv hodnoty pH pufru na retenci a enantioseparaci nebyl zdaleka tak jednoznačný. Vliv různého pH 0,5% TEAA pufru na retenci FMOC-L-enantiomerů byl v obou mobilních fázích s různým obsahem organického modifikátoru shodný. Čím větší byla hodnota pH, tím kratší byla retence FMOC-L-enantiomerů.

Vliv pH vodné složky na retenci FMOC-D-enantiomerů v separačním prostředí byl podobný v obou mobilních fázích s různým obsahem methanolu. Retence derivátů D-enantiomerů se při 40 obj. % methanolu s rostoucím pH pufru prodlužovala až do hodnoty pH 5,0. Při tomto pH pufru byla retence všech derivátů D-enantiomerů nejdelší (FMOC-D-enantiomery eluovaly do 24 min). Od hodnoty pH 5,0 do pH 6,5 se naopak retence začala zkracovat. V mobilní fázi s 40 obj. % methanolu dosáhl změnou pH pufru z hodnoty 5,0 na hodnotu 6,0 největšího zkrácení retenčního času FMOC-D-Leu (o 6 min) a nejmenšího FMOC-D-Val (o 4 min).

Podobný vliv pH pufru na retenci derivátů D-enantiomerů byl pozorován i v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu až na hodnotu pH 4,5 při které nastalo u všech derivátů snížení retence. Za tohoto obsahu organické složky (50 obj. %) bylo největšího zkrácení

retenčního času změnou pH pufru z hodnoty 5,0 na 6,0 dosaženo u FMOC-D-Ala (o 2 min) a nejmenšího u FMOC-D-Ile (o 1 min).

U analytů, u kterých lze porovnat hodnoty enantiozlišení při různých hodnotách pH pufru je patrné, že čím vyšší bylo pH, tím menšího rozlišení mezi enantiomery bylo docíleno. Tento jev je pravděpodobně vyvolán zkracující se retencí obou derivátů enantiomerů. Jistý trend v ovlivnění enantioselektivity různým pH pufru nelze díky koeluci píků přesně určit, ale lze tvrdit, že v obou mobilních fázích o různém obsahu methanolu byla enantioselektivita analytů vyšší při vyšších hodnotách pH. Nejvyšších hodnot enantioselektivity v obou typech mobilní fáze tedy s 50 a 40 obj. % methanolu o pH vodné složky v proměřovaném rozsahu dosahoval vždy FMOC-D/L-Leu a naopak nejnižších FMOC-D/L-Val.

Určitý vliv různé hodnoty pH pufru na eluční pořadí FMOC-L-enantiomerů v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu byl pozorován a žádný stálý trend v eluci tudíž nenastal. Navíc retenční časy derivátů L-enantiomerů se velmi podobaly ve všech mobilních fázích o různém pH vodné složky s 50% zastoupením methanolu. Patrný trend v retenčním pořadí FMOC-D-enantiomerů v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu o různém pH pufru však již nastal. V každé mobilní fázi s 50% obsahem organického modifikátoru o různé hodnotě pH vodné složky eluoval s nejkratším retenčním časem vždy FMOC-D-Val následovaný FMOC-D-Ile. Teprve po těchto dvou analytech eluovaly FMOC-D-Ala a FMOC-D-Leu jejichž vzájemná pozice v elučním pořadí byla různá v závislosti na pH. Určité pořadí v eluci tří FMOC-D-enantiomerů lze ale i přes to určit: FMOC-D-Val < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu.

V mobilní fázi s 40 obj. % methanolu nebyl vliv různého pH pufru na eluční pořadí FMOC-L-enantiomerů tak výrazný. Ze získaných dat, lze vypořovat, že ve všech mobilních fázích s 40 % zastoupením methanolu o různých hodnotách pH pufru eluoval vždy jako první FMOC-L-Val s nejkratší retencí a FMOC-L-Ile eluoval vždy před FMOC-L-Leu kromě pH 4,0, kdy tomu bylo naopak. Pozice FMOC-L-Ala byla ale však různá v závislosti na konkrétním pH vodné složky. Derivát FMOC-L-Val se také nejvíce odlišoval retencí od ostatních FMOC-L-enantiomerů jejichž retenční časy byly velmi podobné. V elučním pořadí FMOC-D-enantiomerů aminokyselin byl při 40 obj. % methanolu patrný jednoznačný trend, na který různé hodnoty pH pufru neměly vliv.

FMOC-D-enantiomery eluovaly vždy v následujícím pořadí: FMOC-D-Val < FMOC-D-Ala < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu.

Různý obsah methanolu v mobilních fázích o pH vodné složky 4,0 a 5,0 vyvolal také záměnu v retenčním pořadí FMOC-D-enantiomerů. V mobilní fázi s 50 obj. % methanolu dosahoval FMOC-D-Ala nejdelšího retenčního času a eluoval jako poslední, přičemž při 40 obj. % methanolu eluoval jako druhý v pořadí. V mobilní fázi o hodnotě pH TEAA pufru 6,0 vyvolal pokles organického modifikátoru rovněž změnu v elučním pořadí derivátů D-enantiomerů. V mobilní fázi s 50% obsahem methanolu analyt FMOC-D-Ala eluoval jako třetí v již uvedeném pořadí a při 40 obj. % eluoval jako druhý. Tato záměna je vyvolána pravděpodobně tím, že různý obsah organického modifikátoru měl největší vliv na retenci (prodloužení) u FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile ze všech derivátů D-enantiomerů aminokyselin.

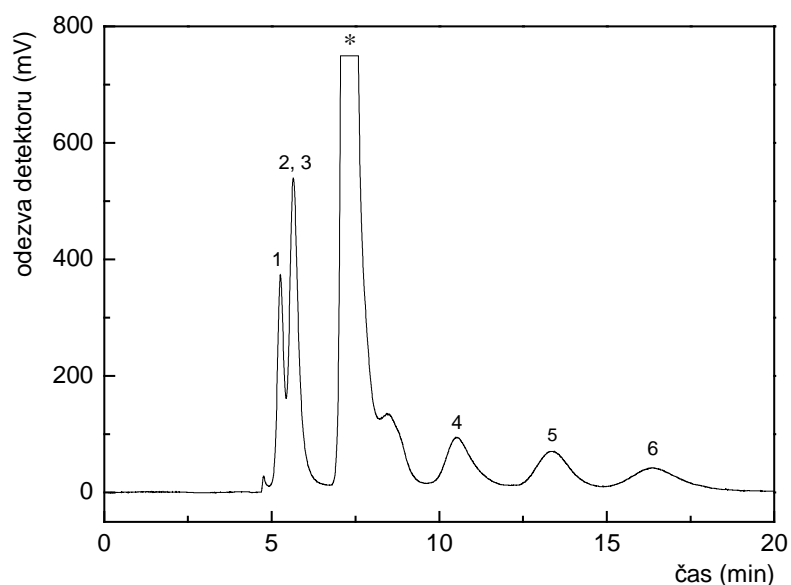
Z uvedených chromatografických dat vyplývá, že v žádné z proměřovaných mobilních fází s 50% zastoupením methanolu a pH TEAA pufru v rozsahu 4,0 – 6,5 nebylo možné u FMOC-D/L-Val určit enantiorozlišení. Při tomto obsahu organického modifikátoru a hodnotě pH pufru 5,5 bylo zjistitelné enantiorozlišení alespoň u třech FMOC-D/L-aminokyselin, přičemž největšího chirálního rozlišení ($R = 10,60$) bylo docíleno u FMOC-D/L-Leu i přes relativně krátkou retenci do 10 minut.

Jako v jediné ze všech typů proměřovaných mobilních fází, ve které bylo možné určit enantiorozlišení u všech čtyřech studovaných FMOC derivátů aminokyselin, byla mobilní fáze o složení 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0. V této mobilní fázi eluoval ze všech derivátů D-aminokyselin nejdéle (do 18 min) FMOC-D-Leu a nejvyšší hodnoty enantiorozlišení ($R = 7,28$) bylo dosaženo u FMOC-D/L-Ala.

Je tedy patrné, že tato mobilní fáze o složení 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 umožňovala jako jediná ze všech proměřovaných typů odseparování všech FMOC-L- a FMOC-D-enantiomerů studovaných aminokyselin od píku derivatizačního činidla. Navíc, při tomto složení, byly retenční časy FMOC-D-Val, FMOC-D-Ala a FMOC-D-Leu natolik odlišné, že umožňovaly vzájemnou separaci ve směsi jejich racemátů s možností dosáhnutí dobrého rozlišení. Z hodnoty retenčního času FMOC-D-Ile však vyplynulo, že při separaci směsi všech čtyřech derivatizovaných D/L-aminokyselin dojde ke koeluci tohoto FMOC-D-enantiomeru s píky analytů FMOC-D-Ala a FMOC-D-Leu.

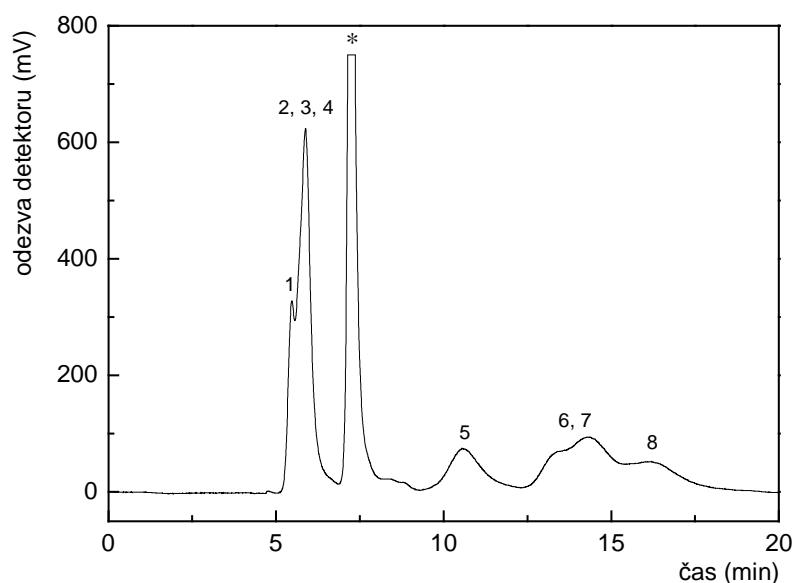
Pro následné chirální separace byly připraveny směsi o různém složení D/L-aminokyselin. První směs obsahovala pouze aminokyseliny D/L-Ala, D/L-Val a D/L-Leu, přičemž druhá směs obsahovala veškeré studované racemáty aminokyselin. Studované směsi tří a čtyř derivatizovaných aminokyselin byly připraveny podle vybraných podmínek derivatizace tak, aby koncentrace každé D/L-aminokyseliny ve směsi byla 1 µg/ml.

Při separaci směsi tří derivatizovaných aminokyselin (obr. 12) bylo dosaženo předpokládaného dobrého chirálního rozlišení (až na základní linii) mezi danými FMOC-D-enantiomery. Rozlišení mezi FMOC-D-Val a FMOC-D-Ala dosahovalo hodnoty 1,78, přičemž rozlišení mezi FMOC-D-Ala a FMOC-D-Leu dosahovalo hodnoty 1,64. Z chromatogramu je patrné, že FMOC-L-enantiomery daných aminokyselin částečně koelují. Na základě retenčních časů lze však určit, že první pík patří FMOC-L-Val a druhý pík obsahuje deriváty FMOC-L-Ala a FMOC-L-Leu.



Obr. 12 Enantioseparace směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala a FMOC-D/L-Leu, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Val, 2: FMOC-L-Ala, 3: FMOC-L-Leu, 4: FMOC-D-Val, 5: FMOC-D-Ala, 6: FMOC-D-Leu, *: derivatizační činidlo.

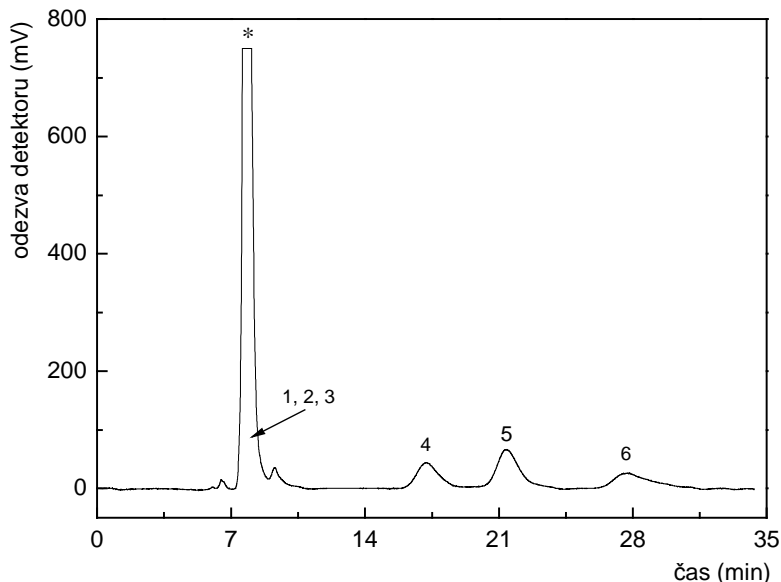
Separace směsi čtyř derivatizovaných aminokyselin (obr. 13) v mobilní fázi 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 nepřinesla podle předpokladu bohužel uspokojivé hodnoty v rozlišení mezi FMOC-D-enantiomery. Ze záznamu enantioseparace je vidět, že FMOC-L-enantiomery téměř úplně koelují (lze odlišit opět pouze FMOC-L-Val) a z FMOC-D-enantiomerů lze s jistotou určit pouze FMOC-D-Val, zbylé tři deriváty D-enantiomerů koelují v jednom píku.



Obr. 13 Enantioseparace směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Ile a FMOC-D/L-Leu, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Val, 2: FMOC-L-Ala, 3: FMOC-L-Leu, 4: FMOC-L-Ile, 5: FMOC-D-Val, 6: FMOC-D-Ala, 7: FMOC-D-Ile, 8: FMOC-D-Leu, *: derivatizační činidlo.

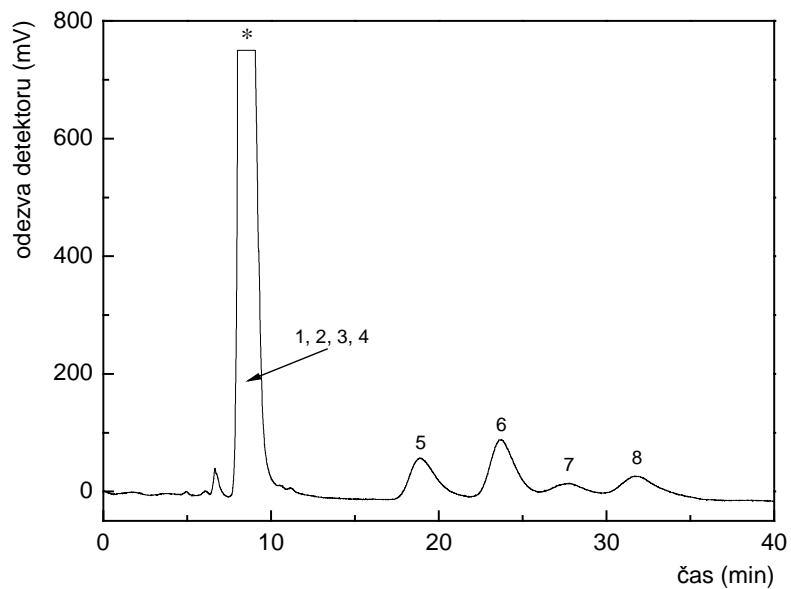
K získání lepšího rozlišení mezi FMOC-D-enantiomery ve směsích bylo dále přistoupeno k optimalizaci složení mobilní fáze 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr. Půlprocentní TEAA pufr o pH 6,0 byl nahrazen jednocentním TEAA pufrem o pH 6,0. Zvýšení koncentrace pufru o totožném pH vedlo k podstatnému zvýšení retence u všech analytů, která měla za následek úplnou koeluci derivátů L-enantiomerů s píkem derivatizačního činidla. Mezi FMOC-D-enantiomery došlo vlivem delší retence sice k

lepší vzájemné separaci, ale také zejména u FMOC-D-Leu k rozmytí zóny eluční křivky tohoto derivátu (obr. 14



Obr. 14 Enantioseparace směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala a FMOC-D/L-Leu, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Val, 2: FMOC-L-Ala, 3: FMOC-L-Leu, 4: FMOC-D-Val, 5: FMOC-D-Ala, 6: FMOC-D-Leu, *: derivatizační činidlo.

Vzájemná separace derivátů D-enantiomerů ve směsi čtyř racemátů aminokyselin byla při tomto složení mobilní fáze však stále neuspokojivá a proto byl obsah methanolu snížen na 38 obj. %. Záznam enantioseparace této směsi v mobilní fázi o složení 38/62 (v/v) MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0 je uveden na obr. 15. V tomto separačním systému bylo dosaženo relativně dobré symetrie všech FMOC-D-enantiomerů i přes dlouhou retenci a rozlišení bylo také uspokojivé. Bohužel úplné chirální diskriminace, až na základní linii, nebylo mezi všemi FMOC-D-enantiomery docíleno. Hodnota rozlišení mezi FMOC-D-Val a FMOC-D-Ala byla 1,66 mezi FMOC-D-Ala a FMOC-D-Ile byla 1,04 a mezi FMOC-D-Ile a FMOC-D-Leu byla 0,83.



Obr. 15 Enantioseparace směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Ile a FMOC-D/L-Leu, kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0 **38/62** (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Val, 2: FMOC-L-Ala, 3: FMOC-L-Leu, 4: FMOC-L-Ile, 5: FMOC-D-Val, 6: FMOC-D-Ala, 7: FMOC-D-Ile, 8: FMOC-D-Leu, *: derivatizační činidlo.

4.6.1 Kalibrační závislosti FMOC-aminokyselin

Na koloně Chirobiotic T byly za fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min a při optimalizovaném složení mobilních fází proměřeny kalibrační závislosti plochy i výšky píků na koncentraci FMOC-D/L-aminokyselin jak pro jednotlivé FMOC-L-enantiomery a FMOC-D-enantiomery aminokyselin, tak i pro FMOC-D-enantiomery aminokyselin ve směsích. Optimalizované složení mobilní fáze pro enantioseparace jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin a směsi tří FMOC-D/L-aminokyselin bylo 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA, pH 6,0. Pro enantioseparace směsi čtyř aminokyselin bylo optimalizované složení mobilní fáze 38/62 (v/v) MeOH/1% TEAA, pH 6,0. Pro všechny deriváty D-enantiomerů byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Při enantioseparacích jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin byly LOD a LOQ stanoveny i pro FMOC-L-enantiomery.

LOD a LOQ byly vypočteny z regresních rovnic získaných ze závislosti výšky píků FMOC-L- či FMOC-D-enantiomerů na koncentraci, jako trojnásobek resp. desetinásobek hodnoty šumu. Na daných koncentračních hladinách bylo každé měření provedeno třikrát.

4.6.1.1 Kalibrační závislosti jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin

Jednotlivé FMOC-D/L-aminokyseliny byly proměřeny v koncentračním rozsahu 0,05 – 5 $\mu\text{g/ml}$. Kalibrační roztoky o požadovaných koncentracích byly připraveny postupným ředěním derivatizovaného standardu každé D/L-aminokyseliny o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Při koncentraci 2,5 $\mu\text{g/ml}$ FMOC-D/L-aminokyselin poskytovaly veškeré FMOC-L-enantiomery signál nad rozsah detekce znemožňující jejich vyhodnocení. Z tohoto důvodu je v kalibračních závislostech derivátů L-enantiomerů uvedena jako nejvyšší proměřovaná koncentrace FMOC-D/L-aminokyselin 1 $\mu\text{g/ml}$. Koncentrační závislosti plochy a výšky píků FMOC-L- a FMOC-D-enantiomerů aminokyselin byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tab. 6 a pro výšky píků v tab. 7. Vypočtené limity detekce a limity stanovitelnosti jsou zaznamenány v tab. 8.

Tabulka 6. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti plochy píků pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	R^2
FMOC-L-Val	14072,9 (111,9)	-144,0 (31,4)	0,9999
FMOC-L-Ala	19521,1 (266,8)	-81,7 (74,9)	0,9996
FMOC-L-Ile	16745,9 (100,8)	-59,8 (28,3)	0,9999
FMOC-L-Leu	13683,2 (207,7)	-132,4 (58,4)	0,9995
FMOC-D-Val	13888,8 (141,9)	-305,2 (165,1)	0,9996
FMOC-D-Ala	18582,5 (52,4)	3,1 (51,9)	1,0000
FMOC-D-Ile	9740,1 (19,2)	-51,7 (22,4)	1,0000
FMOC-D-Leu	13193,3 (73,1)	-191,2 (85,0)	0,9999

Tabulka 7. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti výšky píků pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 7, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [mV]	R^2
FMOC-L-Val	876,8 (18,4)	-3,2 (5,2)	0,9991
FMOC-L-Ala	1085,2 (22,5)	-1,6 (6,3)	0,9991
FMOC-L-Ile	863,9 (12,1)	-2,5 (3,4)	0,9996
FMOC-L-Leu	815,4 (8,8)	-5,9 (2,5)	0,9998
FMOC-D-Val	224,4 (9,6)	-14,3 (11,1)	0,9928
FMOC-D-Ala	274,6 (1,9)	-3,8 (1,9)	0,9998
FMOC-D-Ile	101,6 (1,1)	-2,4 (1,3)	0,9995
FMOC-D-Leu	150,2 (2,0)	-4,3 (2,4)	0,9993

Z tabulky 7 a 8 je patrné, že při kalibračních závislostech pro plochy i výšky píků na koncentraci, dosahovaly koeficienty determinace vysokých hodnot, což vypovídá o velmi dobré linearitě závislostí. Hodnoty úseků v regresních rovnicích byly u derivátů L- či D-enantiomerů velmi malé. Derivát FMOC-D-Val se hodnotami koeficientu determinace a úseku odlišoval od ostatních derivátů D-forem aminokyselin. Tento rozdíl je pravděpodobně zapříčiněn blízkou elucí FMOC-D-Val a derivatizačního

činitla, která při proměřování vyšších koncentrací zejména při 5 µg/ml znesnadňovala vyhodnocení plochy i výšky píku.

Tabulka 8. Limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 7.

analyt	LOD [ng·ml ⁻¹]	LOQ [ng·ml ⁻¹]
FMOC-L-Val	2,3	7,8
FMOC-L-Ala	1,9	6,4
FMOC-L-Ile	2,5	8,2
FMOC-L-Leu	2,3	7,7
FMOC-D-Val	9,1	30,3
FMOC-D-Ala	7,5	25,1
FMOC-D-Ile	21,0	69,9
FMOC-D-Leu	12,6	41,9

Tabulka 8 ukazuje, že limity detekce a limity stanovitelnosti FMOC-L-enantiomerů se pohybovaly řádově v jednotkách ng/ml. V případě FMOC-D-enantiomerů se pohybovaly spíše v desítkách ng/ml, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro FMOC-D/L-Ile a nejnižších pro FMOC-D/L-Ala. Při výpočtech limitů detekce a limitů stanovitelnosti byly hodnoty úseků zanedbány. Při testování statistické významnosti úseku *t*-testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ bylo prokázáno, že se jeho hodnoty výrazně neliší od nuly a tudíž významně neovlivňují hodnoty LOD a LOQ.

4.6.1.2 Kalibrační závislosti derivátů D-enantiomerů ve směsi tří FMOC-D/L-aminokyselin

Jak bylo výše uvedeno, jako optimální složení mobilní fáze pro separaci směsi derivatizovaných racemátů aminokyselin valinu, alaninu a leucinu bylo zvoleno 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0. V této mobilní fázi docházelo k vzájemné koeluci FMOC-L-enantiomerů, zatímco FMOC-D-enantiomery eluovaly každý zvlášť. Z tohoto důvodu byly při kalibraci vyhodnoceny pouze plochy a výšky píků derivátů D-forem aminokyselin. Kalibrační závislosti byly proměřeny ve stejném rozsahu koncentrací jako u jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin, tedy 0,05 – 5 µg/ml.

Kalibrační roztoky o požadovaných koncentracích byly připraveny opět postupným ředěním standardu derivatizované směsi ve které byla koncentrace každé jednotlivé FMOC-D/L-aminokyseliny 5 µg/ml. Koncentrační závislosti plochy a výšky píků FMOC-D-enantiomerů aminokyselin byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tab. 9 a pro výšky píků v tab. 10. Vypočtené limity detekce a limity stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 11.

Tabulka 9. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti plochy píků FMOC-D-enantiomerů ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala a FMOC-D/L-Leu, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 6, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	R^2
FMOC-D-Val	13665,9 (369,2)	-599,0 (485,9)	0,9964
FMOC-D-Ala	18733,1 (251,9)	-331,9 (249,3)	0,9993
FMOC-D-Leu	9550,7 (159,2)	-379,5 (209,5)	0,9986

Tabulka 10. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti výšky píků FMOC-D-enantiomerů ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala a FMOC-D/L-Leu, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 6, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [mV]	R^2
FMOC-D-Val	219,3 (9,9)	-14,3 (12,9)	0,9900
FMOC-D-Ala	286,7 (4,2)	-7,9 (4,1)	0,9992
FMOC-D-Leu	116,2 (3,2)	-7,0 (4,3)	0,9961

Tabulka 11. Limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ) pro FMOC-D-enantiomery ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala a FMOC-D/L-Leu, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 7.

analyt	LOD [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]
FMOC-D-Val	14,8	49,2
FMOC-D-Ala	11,3	37,7
FMOC-D-Leu	27,9	92,9

Pro kalibračních závislostech plochy a výšky píků na koncentraci vybraných FMOC-D-aminokyselin (tab. 9 a 10), dosahovaly koeficienty determinace poměrně vysokých hodnot svědčících o dobré linearitě závislostí. Hodnoty úseků v regresních rovnicích byly velmi malé. Stejně tak, jako při kvantifikaci jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin se derivát FMOC-D-Val hodnotami koeficientu determinace a úseku odlišoval od ostatních FMOC-D-enantiomerů. Pravděpodobně ze stejných důvodů, jaké byly popsány při kvantifikaci jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin.

Limity detekce a limity stanovitelnosti daných derivátů D-forem aminokyselin ve směsi se pohybovaly řádově v desítkách ng/ml (tab. 11) a byly vyšší (v případě FMOC-D-Leu dokonce dvojnásobné) než limity získané pro jednotlivé FMOC-D-enantiomery aminokyselin (tab. 8). Hodnoty úseku byly opět pro svou statistickou nevýznamnost (testováno *t*-testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$) při výpočtech LOD a LOQ zanedbány.

4.6.1.3 Kalibrační závislosti derivátů D-enantiomerů v směsi čtyř FMOC-D/L-aminokyselin

Mobilní fáze o složení 38/62 (v/v) MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0 byla použita pro separaci směsi všech čtyř derivatizovaných racemátů aminokyselin valinu, alaninu, isoleucinu a leucinu. Při tomto složení mobilní fáze všechny FMOC-L-enantiomery zcela koeluovaly s derivatizačním činidlem v jeden pík, zatímco u FMOC-D-enantiomerů bylo dosaženo alespoň částečné separace s příslušnými hodnotami rozlišení. Kalibrační závislosti byly proměřeny ve stejném rozsahu koncentrací (0,05 – 5 $\mu\text{g/ml}$) jako u jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin. Kalibrační roztoky o požadovaných koncentracích byly připraveny opět postupným ředěním standardu derivatizované směsi, ve které byla koncentrace každé jednotlivé FMOC-D/L-aminokyseliny 5 $\mu\text{g/ml}$. Kalibrační závislosti plochy a výšky píků derivátů D-forem byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tab. 12 a pro výšky píků v tab. 13. Vypočtené limity detekce a limity stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 14.

Tabulka 12. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti plochy píků FMOC-D-enantiomerů ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Ile a FMOC-D/L-Leu. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T, mobilní fáze MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0 38/62 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	R^2
FMOC-D-Val	11279,8 (330,2)	526,1 (384,4)	0,9969
FMOC-D-Ala	10785,4 (613,7)	1142,1 (714,4)	0,9872
FMOC-D-Ile	2918,5 (46,0)	76,1 (58,7)	0,9993
FMOC-D-Leu	7738,2 (227,6)	499,0 (290,2)	0,9974

Tabulka 13. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti výšky píků FMOC-D-enantiomerů ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Ile a FMOC-D/L-Leu, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 12, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [mV]	R^2
FMOC-D-Val	126,6 (2,5)	3,1 (2,9)	0,9984
FMOC-D-Ala	144,5 (4,7)	7,8 (5,4)	0,9958
FMOC-D-Ile	33,9 (0,5)	-0,7 (0,6)	0,9995
FMOC-D-Leu	57,3 (3,4)	4,4 (4,3)	0,9898

Tabulka 14. Limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ) pro FMOC-D-enantiomery ve směsi FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Ala, FMOC-D/L-Ile a FMOC-D/L-Leu, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 12.

analyt	LOD [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]
FMOC-D-Val	20,3	67,9
FMOC-D-Ala	17,9	59,5
FMOC-D-Ile	76,1	253,7
FMOC-D-Leu	45,0	150,1

Z dat uvedených v tab. 12 lze vypořadovat, že při koncentračních závislostech plochy píků byl z důvodu neúplné separace FMOC-D-Ala od FMOC-D-Ile ve směsi získán nejnižší koeficient determinace a nejvyšší hodnota úseku v regresní rovnici právě u derivátu D-alaninu.

Při koncentračních závislostech výšky píků (tab. 13) byly hodnoty úseku v regresních rovnicích velmi malé a koeficienty determinace dosahovaly, i přes neúplnou vzájemnou separaci derivátů D-forem aminokyselin, uspokojivých hodnot.

Z tabulky 14 je patrné, že limity detekce a limity stanovitelnosti FMOC-D-enatiomerů v směsi čtyř derivatizovaných aminokyselin dosahovaly řádově desítek ng/ml. Výjimkou jsou FMOC-D-Ile a FMOC-D-Leu u nichž se limity stanovitelnosti pohybovaly v desetínách $\mu\text{g/ml}$. Takto vysoké hodnoty jsou zapříčiněné neúplným odseparováním FMOC-D-Ile od derivátů D-alaninu a D-leucinu. Hodnoty úseků byly při výpočtech LOD a LOQ zanedbány z důvodu statistické nevýznamnosti (testováno *t*-testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

Ve všech provedených kalibračních závislostech byla dosažena velmi dobrá citlivost detekce pohybující se řádově v $\mu\text{g/l}$. Takto vysoká citlivost dané metody je srovnatelná s hmotnostní detekcí.

4.7 Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin v pufované mobilní fázi na koloně Chirobiotic T2

Na koloně Chirobiotic T2 vyznačující se vyšším obsahem navázaného teikoplaninu, vyšší porozitou silikagelu a delším spojovacím řetězcem mezi chirálním selektorem a silikagelem bylo za podmínek derivatizace vybraných na koloně Chirobiotic T studováno retenční a enantioseparační chování FMOC-derivatizovaných aminokyselin v mobilních fázích o stejném složení jako pro kolonu Chirobiotic T.

Naměřené hodnoty retenčních a enantioseparačních parametrů, v mobilních fázích MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a různém objemovém zastoupení methanol/pufr, jsou uvedeny v tab. 15. Pro enantioseparace byly zvoleny opět mobilní fáze s 50 a 40 obj. % organického modifikátoru. Při daném obsahu methanolu se pH vodného 0,5% TEAA pufru pohybovalo v rozmezí 4,0 – 6,5. V každé z testovaných mobilních fází eluovaly FMOC-L-enantiomery aminokyselin před jejich FMOC-D-analogy, což bylo znovu potvrzeno standardním přidavkem jednotlivých FMOC-D-enantiomerů.

V průběhu chirálních separací docházelo opět k částečné nebo dokonce k úplné koeluci FMOC-L- či FMOC-D-enantiomerů aminokyselin s píkem derivatizačního činidla (v tabulce označen jako FMOC-OH). Z tohoto důvodu nebylo možné u mnoha separací určit rozlišení mezi enantiomery. Různé druhy koeluce jsou v tab. 15 symbolizovány písmeny *a* – *f*. Jednotlivé případy s označením *a* – *e* jsou stejné jako již dříve popsané koeluce při enantioseparacích na koloně Chirobiotic T ilustrované na obr. 11. Označení písmenem *f* symbolizuje částečnou koeluci derivátu D-formy aminokyseliny z levé strany píku derivatizačního činidla, která se při enantioseparacích na koloně Chirobiotic T nevyskytovala. Pro znázornění je pod stejným označením na obr. 16 zaznamenán průběh enantioseparace FMOC-D/L-Leu v mobilní fázi MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,5 50/50 (v/v). Hodnoty enantioselektivity byly určeny stejným způsobem jako v tab. 5.

Tabulka 15. Vliv různého obsahu methanolu a hodnoty pH 0,5% TEAA pufru v mobilní fázi na retenci a separaci FMOC derivátů D/L-aminokyselin, označení stejné jako v tabulce 2. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic T2, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm.

FMOC-D/L-aminokyselina								
Ala								
MeOH/0,5% TEAA pufr, (v/v)								
pH pufru	50/50				40/60			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
4,0	4,37 ^c	6,89	x ^g	1,58	10,94	18,23	3,18	1,67
4,5	3,45 ^a	6,62	x ^g	1,92	8,75 ^c	18,22	x ^g	2,08
5,0	2,23	4,63	3,67	2,08	5,95 ^b	13,72	x ^g	2,31
5,5	1,85	3,92 ^e	x ^g	2,12	5,29 ^b	12,43	x ^g	2,35
6,0	1,51	3,27 ^e	x ^g	2,17	4,27	10,09	3,44	2,36
6,5	1,74	3,35 ^d	x ^g	1,93	4,39	11,53	3,86	2,63
Val								
4,0	4,77 ^c	5,21	x ^g	1,09	12,67	13,85	0,60	1,09
4,5	3,49 ^a	3,91 ^e	x ^g	1,12	9,71 ^c	11,82	x ^g	1,15
5,0	1,96	2,44	1,15	1,24	6,24 ^b	7,06 ^d	x ^g	1,13
5,5	1,52	1,91	1,10	1,25	5,38	7,55 ^d	x ^g	1,40
6,0	1,11	1,42	1,01	1,28	3,71	4,85	1,22	1,31
6,5	1,45	1,86	1,06	1,28	3,93	5,22	1,16	1,33
Leu								
4,0	5,26	6,58	1,59	1,25	17,41	22,25	1,52	1,28
4,5	3,44 ^a	5,65	x ^g	1,64	12,14	18,99	2,06	1,56
5,0	2,14	3,59 ^e	x ^g	1,68	6,82 ^a	13,17	x ^g	1,93
5,5	1,72	2,94 ^d	x ^g	1,71	6,05 ^b	11,93	x ^g	1,97
6,0	1,26	2,19	2,45	1,74	3,77	7,55 ^e	x ^g	2,00
6,5	1,52	2,85 ^f	x ^g	1,88	4,17	8,86 ^e	x ^g	2,12
Ile								
4,0	5,40	6,17	0,95	1,14	16,80	19,21	0,86	1,14
4,5	3,54 ^a	5,23	x ^g	1,48	12,74	16,11	1,19	1,26
5,0	2,14	2,99 ^d	x ^g	1,40	6,92 ^a	11,21	x ^g	1,62
5,5	1,64	2,33 ^f	x ^g	1,42	6,45 ^b	10,27 ^e	x ^g	1,59
6,0	1,22	1,77	1,72	1,45	4,09	6,39 ^d	x ^g	1,56
6,5	1,45	2,26	1,71	1,56	4,53	7,52 ^d	x ^g	1,66

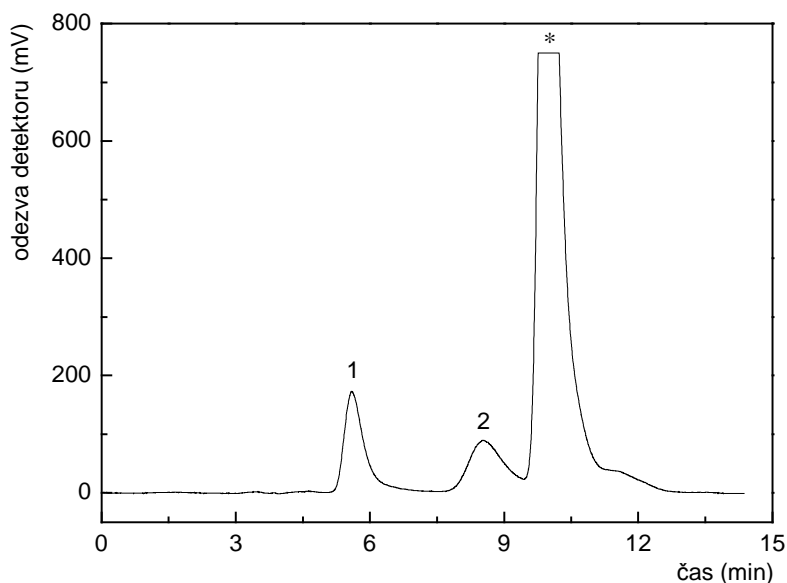
^a úplná koeluce FMOC-L-enantiomeru s FMOC-OH

^{b,c} částečná koeluce FMOC-L-enantiomeru s FMOC-OH

^d úplná koeluce FMOC-D-enantiomeru s FMOC-OH

^{e,f} částečná koeluce FMOC-D-enantiomeru s FMOC-OH

^g enantiorozlišení nelze určit



Obr. 16 Enantioseparace Fmoc-D/L-Leu znázorňující částečnou koeluci derivátu D-enantiomeru z levé strany píku derivatizačního činidla (*f*), kolona Chirobiotic T2, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,5 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: Fmoc-L-Leu, 2: Fmoc-D-Leu, * : derivatizační činidlo.

Ze získaných údajů je patrné, že s vyšším zastoupením vodné složky v mobilní fázi docházelo u všech derivátů aminokyselin k nárůstu hodnot retenčních faktorů. V mobilních fázích o určitém pH TEAA pufru vyvolal v některých případech pokles obsahu methanolu částečnou nebo úplnou koeluci analytů s derivatizačním činidlem, jindy vedl naopak k odseparování obou enantiomerů od derivatizačního činidla. V obou mobilních fázích s různým obsahem methanolu při pH vodné složky 4,0 dosahovaly veškeré studované deriváty nejdelších retenčních časů a naopak při pH 6,0 bylo zadržení analytů v separačním prostředí nejkratší. V mobilní fázi s 50 obj. % methanolu o pH vodné složky 4,0 probíhala tedy eluce derivátů D-enantiomerů do 19 min, zatímco při pH 6,0 do 11 min. V mobilní fázi s nižším obsahem organického modifikátoru tj. 40 obj. % o pH vodné složky 4,0 eluovaly deriváty D-enantiomerů do 53 min, přičemž při pH 6,0 eluce dosahovala 26 min.

Výrazný nárůst retence vyvolaný poklesem obsahu organického modifikátoru v mobilní fázi se při pH 4,0 nejvíce projevil u FMOC-D-Leu (o 35 min). Takto dlouhá retence byla doprovázena značným rozmytím zón elučních křivek. Nejmenší nárůst retenčního času přibližně o 20 min nastal u FMOC-D-Val. V mobilních fázích o pH vodné složky 6,0 bylo největší prodloužení retence patrné tentokrát u FMOC-D-Ala (o 15 min). Naopak nejmenší nárůst retence přibližně o 8 min byl pozorován opět u FMOC-D-Val.

Je tedy zřejmé, že nižší zastoupení organického modifikátoru v mobilních fázích poskytovalo analytům delší čas, v některých případech i pro uplatnění stereoselektivních interakcí s chirálním selektorem. Delší doba, kterou analyty strávily v separačním prostředí, však neměla jednoznačný vliv na enantiorozlišení. U FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Ile vedla při pH 4,0 k nepatrnému poklesu hodnot a u FMOC-D/L-Val vedla při pH 6,0 a 6,5 k nepatrnému nárůstu, který byl doprovázený i mírně stoupající enantioselektivitou.

Vliv různého pH 0,5% TEAA pufru na retenci FMOC derivátů L- a D-enantiomerů v mobilních fázích s různým obsahem methanolu byl stejný. Od pH 4,0 do pH 6,0 docházelo u všech analytů k poklesu hodnot retenčních faktorů. Naopak při pH 6,5 byl pozorován nárůst retence u všech studovaných derivátů aminokyselin.

V pufrované mobilní fázi s 50 obj. % methanolu vyvolalo zvýšení pH pufru z hodnoty 4,0 na hodnotu 6,0 největší zkrácení retenčního času u FMOC-D-Ile (o 10 min). Nejmenší zkrácení bylo pozorováno u FMOC-D-Ala (o 8 min). V mobilní fázi s nižším obsahem methanolu tj. 40 obj. % nastalo záměnou pufru o hodnotě pH 4,0 puftrem o pH 6,0 největší zkrácení retence u FMOC-D-Leu (o 33 min) a nejmenší opět u FMOC-D-Ala (o 18 min).

U analytů, u kterých lze porovnat hodnoty enantiorozlišení v mobilní fázi s 50 či 40 obj. % methanolu o různém pH 0,5% TEAA pufru je patrné, že čím větší byly hodnoty pH pufru, tím většího rozlišení mezi enantiomery bylo dosaženo (s výjimkou FMOC-D/L-Val v mobilních fázích s 50 obj. % organického modifikátoru) i navzdory zkracující se retenci. Stoupající rozlišení mezi enantiomery bylo také doprovázeno zlepšující se symetrií obou píků. Výrazný vliv pH na enantioseparaci je dobře patrný u FMOC-D/L-Val v mobilní fázi s 40 obj. % methanolu. Při tomto zastoupení organického modifikátoru bylo změnou pH pufru z hodnoty 4,0 na hodnotu 6,0 docíleno

dvojnásobně vyššího enantiorozlišení (vzrostlo z 0,60 na hodnotu 1,22). Zřetelný vliv pH je také dobře patrný u FMOC-D/L-Ile v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu v níž změna pH pufru z hodnoty 4,0 na 6,0 vyvolala nárůst enantiorozlišení z 0,95 na hodnotu 1,72.

Určitý trend v ovlivnění enantioselektivity různým pH pufru nelze díky koeluci píků přesně určit, ale lze konstatovat, že v obou mobilních fázích o různém obsahu methanolu bylo docíleno vyšší enantioselektivity při vyšších hodnotách pH pufru opět navzdory klesající retenci všech analytů (do pH 6,0). Nejvyšších hodnot enantioselektivity v obou typech mobilní fáze (50 a 40 obj. %) methanolu dosahoval vždy FMOC-D/L-Ala a nejnižších FMOC-D/L-Val.

Různé pH 0,5% TEAA pufru v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu nevyvolávalo výrazné změny v elučním pořadí derivátů L-forem aminokyselin. V každé mobilní fázi s 50% obsahem organického modifikátoru bylo vždy pořadí třech derivátů L-forem následující: FMOC-L-Val < FMOC-L-Leu < FMOC-L-Ile. Výjimkou byl FMOC-L-Ala, který při pH 4,0 eluoval jako první a od pH 5,0 eluoval v daném pořadí jako poslední s nejdelším retenčním časem ze všech derivátů L-enantiomerů. Na eluční pořadí derivátů D-forem aminokyselin neměly různé hodnoty pH pufru vliv. Ve všech pufrovaných mobilních fázích o daných pH vodné složky s 50% zastoupení methanolu bylo pořadí následující: FMOC-D-Val < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu < FMOC-D-Ala.

V mobilní fázi s 40% zastoupením methanolu bylo retenční pořadí derivátů L-forem různé v závislosti na konkrétním pH TEAA pufru. Nebyl tedy pozorován žádný konstantní trend v eluci FMOC-L-enantiomerů. Naopak u derivátů D-forem aminokyselin byl určitý trend již patrný. V každé z proměřovaných mobilních fází s 40 obj. % methanolu byla eluce třech FMOC-D-enantiomerů následující: FMOC-D-Val < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu. V tomto pořadí byla ale pozice FMOC-D-Ala různá v závislosti na konkrétním pH vodné složky mobilní fáze. Při pH 4,0 eluoval po FMOC-D-Val jako druhý, při pH 4,5 eluoval po FMOC-D-Ile jako třetí a od pH 5,0 eluoval jako poslední s nejdelším retenčním časem ze všech FMOC-D-enantiomerů.

Různý obsah methanolu v mobilní fázi o pH vodné složky 4,0 vyvolal tedy také záměnu v elučním pořadí FMOC-D-enantiomerů. V obou mobilních fázích o daném obsahu methanolu tj. 50 a 40 obj. % bylo pořadí tří derivátů D-forem totožné: FMOC-

D-Val < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu. Pozice FMOC-D-Ala se ale lišila. Při 50% zastoupení organického modifikátoru eluoval v uvedeném pořadí po FMOC-D-Leu jako poslední a při 40 obj. % methanolu eluoval po FMOC-D-Val jako druhý. Tato záměna je pravděpodobně vyvolána tím, že různý obsah methanolu měl při daném pH TEAA pufru největší vliv na retenci (prodloužení) FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile ze všech derivátů D-forem. V mobilních fázích o hodnotě pH vodné složky 5,0 a 6,0 nebylo pozorováno ovlivnění elučního pořadí FMOC-D-enantiomerů různým obsahem organického modifikátoru.

Z uvedených chromatografických dat vyplývá, že v žádné z proměřovaných mobilních fází s 50% obsahem methanolu o pH 0,5% TEAA pufru v rozsahu 4,0 – 6,5 nebylo možné určit současně enantiorozlišení u všech studovaných FMOC derivátů aminokyselin. Pouze v mobilní fázi o pH vodné složky 6,0 bylo zjistitelné rozlišení alespoň u třech derivátů, přičemž nejvyšší hodnoty ($R = 2,45$) bylo dosaženo i přes krátkou retenci do 7 minut u FMOC-D/L-Leu.

Ze všech typů testovaných mobilních fází umožňovala určení enantiorozlišení u všech studovaných FMOC derivátů aminokyselin pouze mobilní fáze s 40% zastoupením methanolu a 0,5% TEAA pufrům o pH 4,0. Jak již ale bylo popsáno dříve, v tomto separačním systému dosahovaly analyty nejdelší retence, která vyvolávala značné rozmytí zón elučních křivek a tím nízkou separační účinnost. Navíc FMOC-D/L-Val a FMOC-D/L-Ile podléhaly při tomto složení mobilní fáze pouze částečnému enantiomernímu dělení s nízkými hodnotami enantiorozlišení.

Dále je také patrné, že ani v jedné z testovaných mobilních fází nebylo dosaženo úplné enantiseparace FMOC-D/L-Val až na základní linii. Naopak FMOC-D/L-Ala se jako jediný ze všech studovaných derivátů separoval nejlépe a vždy až na základní linii s vysokými hodnotami rozlišení mezi enantiomery.

Jelikož nebylo nalezeno vhodné složení mobilní fáze, které by zajistilo chirální rozlišení všech nebo alespoň tří studovaných derivátů až na základní linii, nebyly na dané koloně proměřeny žádné typy směsí derivatizovaných aminokyselin. Vzájemná separace FMOC-D-enantiomerů by byla nereálná už jenom kvůli částečné enantioseparaci některých analytů. Nebyly proměřeny ani kalibrační závislosti jednotlivých derivatizovaných aminokyselin, protože námi stanovená podmínka úplné enantioseparace alespoň tří derivátů v mobilní fázi o určitém složení nebyla splněna.

4.8 Separace FMOC-derivatizovaných aminokyselin v pufrované mobilní fázi na koloně Chirobiotic TAG

Za účelem porovnání retenčního a enantioseparačního chování studovaných derivátů na komerčně dostupných kolonách na bázi teikoplaninového a teikoplanin aglykonového chirálního selektoru, byla pro separace zvolena stejná binární mobilní fáze jako u předešlých měření.

S využitím chirální stacionární fáze na bázi teikoplanin aglykonu bylo za podmínek derivatizace vybraných na koloně Chirobiotic T studováno retenční a enantioselektivní chování FMOC-derivatizovaných aminokyselin. Byly hledány optimální podmínky pro enantioseparaci studovaných analytů s cílem vzájemné separace derivátů D-aminokyselin ve směsi až na základní linii.

Mobilní fáze byly tvořeny methanolem jako organickým modifikátorem v různém objemovém zastoupení (55 – 40 obj. %) s vodným 0,5% TEAA pufrem o pH v rozmezí 4,0 – 7,0. Byl sledován jak vliv obsahu organického modifikátoru v mobilních fázích, tak i vliv různého pH 0,5% TEAA pufru při daném obsahu methanolu na vybrané retenční a enantioseparační parametry. Získané výsledky jsou uvedeny v tab. 16. V každé z proměřovaných mobilních fází docházelo opět při separacích k dřívější eluci derivátů L-enantiomerů před jejich D-analogy, což bylo znovu potvrzeno standardním přídatkem FMOC-D-aminokyselin.

V průběhu enantioseparací docházelo k částečné nebo dokonce k úplné koeluci derivátů L- či D-aminokyselin s příkem derivatizačního činidla (v tabulce označen jako FMOC-OH). Z tohoto důvodu opět nebylo možné u mnoha separací určit rozlišení mezi enantiomery. Různé druhy koeluce jsou v tab. 16 symbolizovány písmeny *a* – *f*. Uvedené případy jsou stejné jako již dříve popsané koeluce při enantioseparacích na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic T2 ilustrované na obr. 11 a obr. 16. Hodnoty enantioselektivity byly určeny stejným způsobem jako v tab. 5.

Tabulka 16. Vliv různého obsahu methanolu a hodnoty pH 0,5% TEAA pufru v mobilní fázi na retenci a separaci Fmoc derivátů D/L-aminokyselin, označení stejné jako v tabulce 2. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic TAG, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr o různém pH a v různých objemových poměrech, průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm.

Fmoc-D/L-aminokyselina												
Ala												
MeOH/0,5% TEAA pufr, (v/v)												
pH pufru	55/45				50/50				40/60			
	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$	k_1	k_2	$R_{1,2}$	$\alpha_{1,2}$
4,0	4,16 ^a	7,12	x ^g	1,71	7,42 ^c	11,64	x ^g	1,57	16,61	26,07	2,37	1,57
4,5	3,51 ^b	6,28	x ^g	1,79	5,98 ^a	10,93	x ^g	1,83	13,68 ^c	24,18	x ^g	1,77
5,0	3,07	5,73	3,54	1,87	4,51 ^b	9,80	x ^g	2,17	10,39 ^a	21,18	x ^g	2,04
5,5	2,52	4,94 ^e	x ^g	1,96	3,86 ^b	8,94	x ^g	2,32	9,15 ^b	20,06	x ^g	2,19
6,0	2,04	4,52 ^e	x ^g	2,22	2,80	6,75	3,33	2,41	7,57 ^b	18,83	x ^g	2,49
6,5	1,97	3,82 ^d	x ^g	1,94	2,47	6,25 ^e	x ^g	2,53	7,50 ^b	18,68	x ^g	2,49
7,0	1,94	3,61 ^d	x ^g	1,86	2,29	6,12 ^e	x ^g	2,67	7,25	18,27	3,78	2,52
Val												
4,0	4,09 ^a	5,12 ^e	x ^g	1,25	7,83 ^c	8,86	x ^g	1,13	18,44	20,71	0,64	1,12
4,5	2,87	3,76 ^d	x ^g	1,31	5,14 ^b	6,27 ^e	x ^g	1,22	10,93 ^a	12,81	x ^g	1,17
5,0	1,92	2,76 ^f	x ^g	1,44	3,53	5,76 ^d	x ^g	1,63	8,98 ^b	10,68 ^d	x ^g	1,19
5,5	1,73	2,51	1,39	1,45	2,62	4,14 ^f	x ^g	1,58	7,24	10,45 ^d	x ^g	1,44
6,0	1,58	2,32	1,43	1,47	1,93	2,79	1,59	1,45	5,91	9,62 ^d	x ^g	1,63
6,5	1,49	2,19	1,42	1,47	1,86	2,77	1,52	1,48	5,83	9,13 ^f	x ^g	1,56
7,0	1,27	1,90	1,45	1,50	1,63	2,70	1,43	1,66	5,79	8,91 ^f	x ^g	1,54
Leu												
4,0	5,03 ^c	5,91	x ^g	1,17	9,43	10,95	0,94	1,16	25,53	29,90	0,83	1,17
4,5	3,62 ^a	5,39	x ^g	1,49	5,69 ^a	6,39 ^e	x ^g	1,12	15,24 ^c	22,59	x ^g	1,48
5,0	2,02	3,62 ^d	x ^g	1,79	3,82	5,60 ^d	x ^g	1,47	10,34 ^a	16,13	x ^g	1,56
5,5	1,98	3,26 ^f	x ^g	1,65	2,96	5,18 ^d	x ^g	1,75	8,53 ^b	14,91 ^e	x ^g	1,75
6,0	1,72	2,82 ^f	x ^g	1,64	2,04	3,59 ^f	x ^g	2,22	7,78 ^b	13,59 ^e	x ^g	1,75
6,5	1,67	2,74 ^f	x ^g	1,67	1,95	3,52 ^f	x ^g	1,81	7,15	10,57 ^d	x ^g	1,48
7,0	1,46	2,43	2,10	1,66	1,74	3,53 ^f	x ^g	2,03	6,61	10,40 ^d	x ^g	1,57
Ile												
4,0	5,17 ^c	6,11	x ^g	1,18	9,73	11,63	1,00	1,20	25,89	29,75	0,68	1,15
4,5	3,65 ^a	5,18 ^e	x ^g	1,42	5,75 ^a	6,48 ^e	x ^g	1,13	15,33 ^c	22,71	x ^g	1,48
5,0	2,23	3,75 ^d	x ^g	1,68	3,97	5,76 ^d	x ^g	1,45	10,63 ^a	16,89	x ^g	1,59
5,5	1,99	3,37 ^d	x ^g	1,69	3,32	5,27 ^d	x ^g	1,59	7,96 ^b	14,56 ^e	x ^g	1,83
6,0	1,65	2,87 ^f	x ^g	1,74	2,24	4,00 ^f	x ^g	1,79	7,07	13,13 ^e	x ^g	1,86
6,5	1,61	2,76 ^f	x ^g	1,71	2,03	3,79 ^f	x ^g	1,86	7,01	10,52 ^d	x ^g	1,50
7,0	1,47	2,49	1,97	1,69	1,72	3,45 ^f	x ^g	2,01	6,50	10,37 ^d	x ^g	1,60

^a úplná koeluce Fmoc-L-enantiomeru s Fmoc-OH

^{b,c} částečná koeluce Fmoc-L-enantiomeru s Fmoc-OH

^d úplná koeluce Fmoc-D-enantiomeru s Fmoc-OH

^{e,f} částečná koeluce Fmoc-D-enantiomeru s Fmoc-OH

^g enantiorozlišení nelze určit

Základní trend vyplývající ze zaznamenaných dat je, že s klesajícím obsahem methanolu v mobilních fázích docházelo u všech analytů k nárůstu retenčních časů resp. hodnot retenčních faktorů. V mobilních fázích o určitém pH TEAA pufru vyvolala v některých případech rostoucí retence analytů opět částečnou či úplnou koeluci s derivatizačním činidlem, jindy vedla naopak k odseparování obou enantiomerů od derivatizačního činidla. V rámci proměřovaných obsahů methanolu v mobilních fázích při hodnotě pH pufru 4,0 dosahovaly všechny studované deriváty nejdelších retenčních časů. Při pH 7,0 bylo zadržení analytů v separačním prostředí nejkratší. V mobilní fázi s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu 40 obj. % o pH vodné složky 4,0 probíhala eluce derivátů D-aminokyselin do 65 min, při pH 7,0 do 42 min. Při stejném procentuálním zastoupení 50/50 (v/v) organického modifikátoru a 0,5% TEAA pufru o pH 4,0 probíhala eluce derivátů D-enantiomerů do 27 min, zatímco při pH 7,0 do 16 min. Jelikož při tomto složení mobilní fáze dosahovaly analyty stále relativně vysokých retenčních časů, byly dále proměřeny mobilní fáze s 55 obj. % methanolu. Při tomto obsahu organického modifikátoru o pH vodné složky 4,0 probíhala eluce derivátů D-aminokyselin do 17 min, při pH 7,0 dosahovala 10 min.

Výrazný nárůst retenčního času (o 48 min) vyvolaný poklesem obsahu organického modifikátoru z 55 obj. % na 40 obj. % se při pH pufru 4,0 nejvíce projevil u Fmoc-D-Leu. Takto dlouhá retence byla doprovázena značným rozmytím zón elučních křivek. Nejmenší nárůst retenčního času při tomto pH (o 31 min) byl pozorován u Fmoc-D-Val. V mobilních fázích o pH pufru 7,0 bylo největší prodloužení retence patrné tentokrát u Fmoc-D-Ala (o 30 min), naopak nejmenší nárůst přibližně o 14 min byl pozorován opět u Fmoc-D-Val.

Koeluce analytů s derivatizačním činidlem znemožňovala u mnoha separací určit enantiorozlišení. U analytů u kterých bylo zjištěné a porovnatelné při různém obsahu methanolu o určitém pH pufru je patrné, že delší zadržení derivátů v separačním prostředí vyvolané poklesem obsahu methanolu v mobilních fázích nemělo na enantiorozlišení jednoznačný vliv. U derivátu Fmoc-D/L-Val při pH pufru 6,0 a 6,5 vyvolal pokles methanolu z 55 na 50 obj. % mírný nárůst hodnot enantiorozlišení, který byl však doprovázený prakticky neměnnou enantioselektivitou. Naopak při pH pufru 7,0 tato změna v zastoupení methanolu neměla vliv na hodnotu enantiorozlišení, ale enantioselektivita mírně vzrostla. U Fmoc-D/L-Leu a Fmoc-D/L-Ile při pH vodné

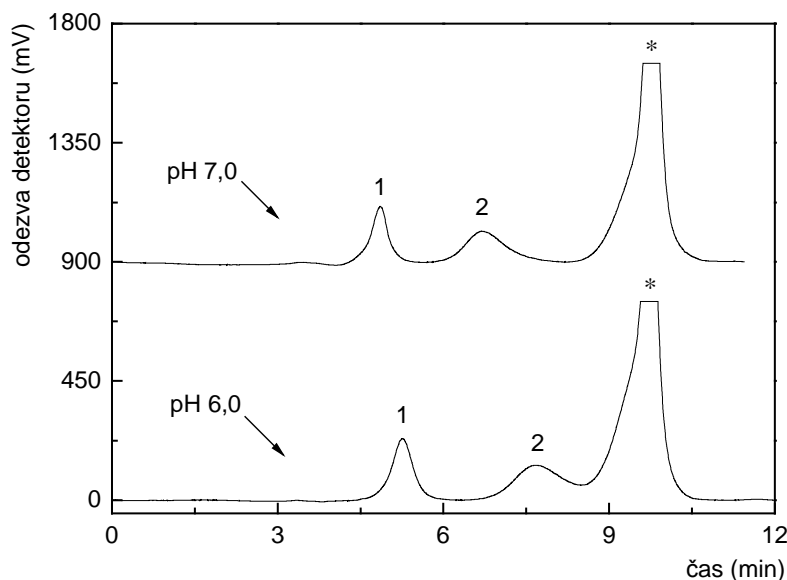
složky 4,0 vyvolala změna v zastoupení methanolu z 50 na 40 obj. % mírný pokles hodnot enantiorozlišení, který byl doprovázený prakticky neměnnou enantioselektivitou.

Vliv pH 0,5% TEAA pufru na retenci derivátů L- a D-enantiomerů v mobilních fázích s různým obsahem methanolu byl stejný. S rostoucím pH pufru docházelo ke zkracování retence všech analytů. V pufrované mobilní fázi s nejvyšším proměřovaným obsahem methanolu 55 obj. % vyvolalo zvýšení pH pufru z hodnoty 4,0 na hodnotu 7,0 největší zkrácení retence u FMOC-D-Ile (o 7,2 min), naopak nejmenší zkrácení bylo pozorováno u FMOC-D-Val (o 6,5 min). V mobilní fázi s obsahem methanolu 50 obj. % bylo záměnou pufru o hodnotě pH 4,0 pufrům o pH 7,0 docílenou největšího zkrácení retence opět u FMOC-D-Ile (o 16 min) a nejmenšího u FMOC-D-Ala (o 11 min). V mobilní fázi s nejnižším proměřovaným obsahem organického modifikátoru 40 obj. % vedla záměna pufru o pH 4,0 pufrům o pH 7,0 k nejmenšímu zkrácení retence opět u FMOC-D-Ala (o 15 min). Největší zkrácení retence při tomto obsahu methanolu nelze ale přesně určit, kvůli úplné koeluci FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile s derivatizačním činidlem v mobilní fázi o hodnotě pH pufru 7,0. Lze ale předpokládat, že retence FMOC-D-Ile byla opět nejvíce ovlivněna.

Vliv pH 0,5% TEAA pufru na chirální diskriminaci v mobilních fázích o určitém obsahu methanolu byl patrný pouze u analytů FMOC-D/L-Val a FMOC-D/L-Ala. Z určených hodnot bylo patrné, že jednoznačný trend v ovlivnění enantiorozlišení různým pH pufru nenastal. V případě FMOC-D/L-Val v mobilní fázi s 55 obj. % methanolu nebylo změnou pH pufru z hodnoty 5,5 na hodnotu 7,0 enantiorozlišení prakticky ovlivněno. Naopak v mobilní fázi s 50% zastoupením methanolu nastal u tohoto analytu změnou pH vodné složky z hodnoty 6,0 na 7,0 nepatrný pokles v enantiorozlišení. U FMOC-D/L-Ala bylo v mobilní fázi s 40 obj. % methanolu záměnou pufru o hodnotě pH 4,0 pufrům o pH 7,0 docíleno lepšího enantiorozlišení, hodnota vzrostla z 2,37 na 3,78 i navzdory kratší retenci.

Pro ukázkou vlivu různého pH 0,5% TEAA pufru na enantioseparaci jsou na obr. 17 zaznamenány průběhy separací FMOC-D/L-Ile v mobilní fázi s 55 obj. % methanolu o hodnotě pH pufru 6,0 nebo 7,0. Z chromatogramu je patrné, že zvýšení pH pufru na hodnotu 7,0 vedlo ke zkrácení retence obou derivatizovaných enantiomerů a k úplnému

odseparování FMOC-D-Ile od derivatizačního činidla. Rozlišení mezi enantiomery pak dosahovalo hodnoty 1,97.



Obr. 17 Chromatogram enantioseparace FMOC-D/L-Ile, mobilní fáze 55/45 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 nebo 7,0; kolona Chirobiotic TAG, průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Ile, 2: FMOC-D-Ile, *: derivatizační činidlo.

Určitý trend v ovlivnění enantioselektivity různým pH vodné složky mobilní fáze o daných obsazích methanolu nelze opět díky koeluci píků přesně určit. Lze ale tvrdit, až na výjimky, že enantioselektivita analytů byla vyšší při vyšších hodnotách pH pufru. Nejvyšších hodnot enantioselektivity ve všech proměřovaných typech mobilních fází dosahoval vždy FMOC-D/L-Ala a nejnižších FMOC-D/L-Val.

Různé hodnoty pH vodné složky mobilní fáze s 55% zastoupením methanolu vyvolávaly změny v elučním pořadí derivátů L-forem aminokyselin. Stálý trend v eluci tudíž nenastal. Lze ale konstatovat, že od pH 5,0 eluoval FMOC-L-Val jako první a FMOC-L-Ala jako poslední s nejdélším retenčním časem. Analyty FMOC-L-Leu a FMOC-L-Ile dosahovaly velmi podobných retenčních časů a jejich vzájemné pořadí bylo různé v závislosti na konkrétním pH pufru. Na elučním pořadí derivátů D-forem aminokyselin neměly různé hodnoty pH pufru vliv. V rámci mobilní fáze s 55%

obsahem methanolu bylo pořadí následující: FMOC-D-Val < FMOC-D-Leu < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Ala, přičemž FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile dosahovaly velmi podobných retencí.

Při stejném procentuálním zastoupení methanolu a pufru 50/50 (v/v) nezpůsobovalo různé pH vodné složky výrazné změny v retenčním pořadí FMOC-L-enantiomerů. V každé mobilní fázi o různé hodnotě pH pufru bylo pořadí třech těchto derivátů následující: FMOC-L-Val < FMOC-L-Leu < FMOC-L-Ile. Výjimkou byl FMOC-L-Ala, který při pH 4,0 eluoval jako první a od pH 5,0 eluoval v daném pořadí jako poslední. Na eluční pořadí FMOC-D-enantiomerů odlišné hodnoty pH pufru neměly výrazný vliv. V mobilní fázi s 50% zastoupením methanolu tyto deriváty eluovaly do pH pufru 6,5 následovně: FMOC-D-Val < FMOC-D-Leu < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Ala. Výjimkou bylo pH 7,0, při kterém eluoval FMOC-D-Ile před FMOC-D-Leu, přičemž tyto dva analyty dosahovaly v každé proměřované mobilní fázi opět velmi podobných retenčních časů.

V mobilní fázi s nejnižším proměřovaným obsahem methanolu 40 obj. % bylo retenční pořadí derivátů L-enantiomerů různé v závislosti na konkrétním pH TEAA pufru. Nebyl tudíž pozorován žádný konstantní trend v eluci těchto analytů. Určení elučního pořadí FMOC-D-enantiomerů při 40% zastoupení methanolu o různém pH pufru znesnadňovala častá úplná koeluce analytů s derivatizačním činidlem, i přesto lze konstatovat, že od hodnoty pH 5,0 eluoval FMOC-D-Val jako první a FMOC-D-Ala jako poslední s nejdelším retenčním časem. Analyty FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile dosahovaly opět velmi podobných retenčních časů a jejich vzájemné pořadí bylo různé v závislosti na konkrétní hodnotě pH pufru.

Různý obsah organického modifikátoru v mobilní fázi o pH vodné složky 4,0 vyvolal také záměnu v elučním pořadí derivátů D-forem aminokyselin. V mobilní fázi s 55 obj. % methanolu bylo pořadí následující: FMOC-D-Val < FMOC-D-Leu < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Ala přičemž při 40% zastoupením methanolu výrazně vzrostla retence u FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile a deriváty D-enantiomerů tak eluovaly v pořadí: FMOC-D-Val < FMOC-D-Ala < FMOC-D-Ile < FMOC-D-Leu. Ovlivnění elučního pořadí FMOC-D-aminokyselin poklesem obsahu methanolu z 55 na 40 obj. % v pufrované mobilní fázi o pH vodné složky 7,0 nebylo zcela patrné z důvodu úplné koeluce FMOC-D-Leu a FMOC-D-Ile s derivatizačním činidlem v mobilní fázi s 40%

zastoupení methanolu. Lze ale konstatovat, že na eluční pořadí FMOC-D-Val a FMOC-D-Ala neměl různý obsah organického modifikátoru v mobilní fázi vliv a FMOC-D-Val eluoval vždy jako první v pořadí a FMOC-D-Ala eluoval pokaždé jako poslední.

Z uvedených chromatografických dat vyplývá, že ze všech proměřovaných typů mobilních fází bylo možné určit enantiozlišení u všech studovaných FMOC-D/L-aminokyselin pouze v mobilní fázi s 40% zastoupením methanolu o pH 0,5% TEAA pufru 4,0. Jak již ale bylo popsáno dříve, v tomto separačním systému dosahovaly analyty nejdelších retenčních časů. Takto dlouhá retence však zapříčinila značné rozmytí zón elučních křivek a tím nízkou separační účinnost. Navíc tři ze čtyřech studovaných analytů podléhaly při tomto složení mobilní fáze pouze částečnému enantiomernímu dělení s nízkými hodnotami enantiozlišení. Dále je patrné že, ze všech studovaných analytů se FMOC-D/L-Ala separoval vždy nejlépe, až na základní linii, s vysokými hodnotami enantiozlišení.

Jako nejvhodnější mobilní fáze pro enantioseparace byla mobilní fáze o složení 55/45 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 7,0, ve které nastalo úplné chirální rozlišení až na základní linii alespoň u třech ze čtyřech studovaných derivátů aminokyselin. Největšího enantiozlišení ($R = 2,10$) bylo při tomto složení mobilní fáze dosaženo u FMOC-D/L-Leu i přes velmi krátkou retenci do 7 minut. Vzájemně blízké retenční časy derivátů D-enantiomerů však neumožňovaly separaci příslušných aminokyselin ve směsi. Z tohoto důvodu byly při tomto složení mobilní fáze proměřeny kalibrační závislosti alespoň u jednotlivých vybraných derivatizovaných aminokyselin.

Na dané koloně, na bázi chirálního selektoru teikoplanin aglykonu, nebylo tedy nalezeno vhodné složení mobilní fáze, které by zajistilo vzájemnou separaci studovaných derivátů D-forem aminokyselin ve směsi s možností dosáhnouti dobrého rozlišení.

4.8.1 Kalibrační závislosti jednotlivých FMOC-D/L-aminokyselin

Za optimalizovaných podmínek separace (mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 7,0 55/45 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm) byly na koloně Chirobiotic TAG proměřeny kalibrační závislosti plochy a výšky píků derivátů L- a D-enantiomerů na koncentraci příslušných FMOC-D/L-aminokyselin. Jak již bylo popsáno, při tomto složení mobilní fáze podléhaly úplné enantiseparaci až na základní linii pouze tři studované analyty, konkrétně FMOC-D/L-Val, FMOC-D/L-Leu a FMOC-D/L-Ile. Vzhledem ke krátké retenci analytů a jí odpovídající vysoké hodnotě odezvy byly kalibrační závislosti těchto jednotlivých derivatizovaných D/L-aminokyselin proměřeny v koncentračním rozsahu 0,05 – 2,5 µg/ml. Kalibrační roztoky o požadovaných koncentracích byly připraveny postupným ředěním derivatizovaného standardu každé D/L-aminokyseliny o koncentraci 2,5 µg/ml. Při nejvyšší proměřované koncentraci poskytovaly veškeré deriváty L-enantiomerů a navíc i FMOC-D-Ile signál nad rozsah detekce znemožňující jejich vyhodnocení. Z tohoto důvodu je v kalibračních závislostech L-forem a FMOC-D-Ile uvedena jako nejvyšší proměřovaná koncentrace derivatizované D/L-aminokyseliny 1 µg/ml.

U derivatizovaných enantiomerů příslušných aminokyselin byly určeny meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ). Meze detekce a meze stanovitelnosti byly vypočteny z regresních rovnic získaných ze závislosti výšky píků derivátů L- či D-enantiomerů na koncentraci, jako trojnásobek resp. desetinásobek hodnoty šumu. Na daných koncentračních hladinách bylo každé měření provedeno třikrát.

Koncentrační závislosti plochy a výšky píků FMOC-L- a FMOC-D-enantiomerů aminokyselin byly zpracovány pomocí lineární regrese, jejíž výsledky jsou pro plochy píků uvedeny v tab. 17 a pro výšky píků v tab. 18. Vypočtené limity detekce a limity stanovitelnosti jsou zaznamenány v tab. 19.

Tabulka 17. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti plochy píků pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin. Experimentální podmínky: kolona Chirobiotic TAG, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 7,0 55/45 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{s}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [$\text{mV}\cdot\text{s}$]	R^2
FMOC-L-Val	14918,2 (376,6)	-137,5 (105,8)	0,9987
FMOC-L-Leu	14691,9 (88,8)	-109,8 (24,9)	0,9999
FMOC-L-Ile	18757,6 (80,9)	-38,9 (22,7)	1,0000
FMOC-D-Val	13619,0 (201,7)	-136,9 (123,6)	0,9993
FMOC-D-Leu	14048,4 (445,4)	-316,0 (272,9)	0,9970
FMOC-D-Ile	22352,8 (224,2)	-47,6 (62,9)	0,9998

Tabulka 18. Regresní rovnice a koeficienty determinace (R^2) získané regresní analýzou koncentrační závislosti výšky píků pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 17, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, $n = 3$.

analyt	směrnice [$\text{mV}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{g}^{-1}$]	úsek [mV]	R^2
FMOC-L-Val	664,7 (33,3)	-11,4 (9,4)	0,9950
FMOC-L-Leu	581,1 (3,4)	-3,8 (0,9)	0,9999
FMOC-L-Ile	982,9 (33,6)	-12,5 (9,4)	0,9977
FMOC-D-Val	354,3 (6,2)	-6,6 (3,8)	0,9991
FMOC-D-Leu	322,6 (15,8)	-10,8 (9,7)	0,9929
FMOC-D-Ile	513,7 (13,0)	1,2 (3,7)	0,9987

Tabulka 19. Limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ) pro jednotlivé FMOC-L- a FMOC-D-enantiomery studovaných aminokyselin, experimentální podmínky jsou stejné jako v tabulce 17.

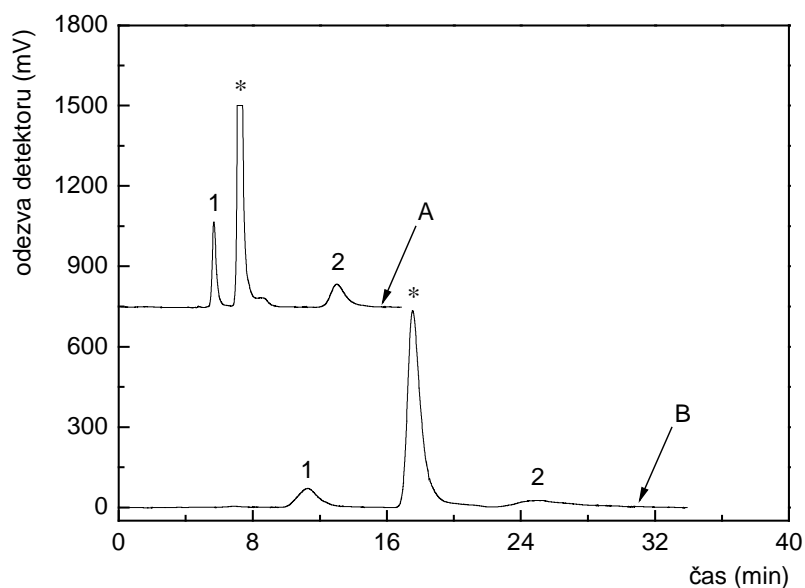
analyt	LOD [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]	LOQ [$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$]
FMOC-L-Val	3,2	10,5
FMOC-L-Leu	4,6	15,5
FMOC-L-Ile	2,8	9,2
FMOC-D-Val	5,9	19,8
FMOC-D-Leu	8,4	27,9
FMOC-D-Ile	5,2	17,5

Při kalibračních závislostech plochy i výšky píků na koncentraci (tab. 17 a 18) dosahovaly koeficienty determinace přijatelných hodnot. Linearita závislostí byla také uspokojivá. Hodnoty úseků v regresních rovnicích u derivátů L- či D-enantiomerů byly velmi malé.

Z tabulky 19 je patrné, že se limity detekce pohybovaly řádově v jednotkách ng/ml a limity stanovitelnosti dosahovaly spíše desítek ng/ml. Nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro FMOC-D/L-Leu a naopak nejnižších pro FMOC-D/L-Ile. Při výpočtech limitů detekce a limitů stanovitelnosti byly hodnoty úseků zanedbány pro svou statistickou nevýznamnost (testováno *t*-testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

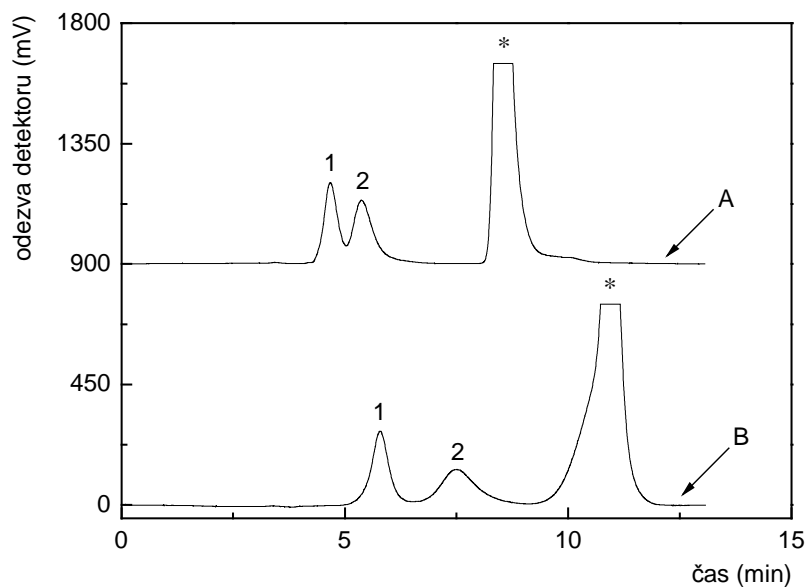
4.9. Vzájemné zhodnocení retenčního a enantioseparačního chování FMOC-D/L aminokyselin na všech třech studovaných chirálních stacionárních fázích

Porovnáním chromatografických dat jednotlivých FMOC derivátů aminokyselin získaných na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic T2 (tab. 5 vs. tab. 15) v korespondujících mobilních fázích o stejném složení je zřejmé, že retence všech analytů byla delší na koloně s vyšším obsahem navázaného teikoplaninu (T2). Oproti tomu u analytů, u kterých lze porovnat hodnoty enantiorozlišení získaných za identických separačních podmínek na obou kolonách, je patrné, že vyšší hodnoty enantiorozlišení a enantioselektivity poskytovala kolona Chirobiotic T. Vyšší stupeň pokrytí silikagelu teikoplaninem tedy na dané koloně nevedl k vyšší účinnosti enantioseparace derivátů aminokyselin. Na obr. 18 je pro znázornění zaznamenán průběh enantioseparace FMOC-D/L-Ala na koloně Chirobiotic T (enantiorozlišení dosahovalo hodnoty 7,28) a Chirobiotic T2 (enantiorozlišení dosahovalo hodnoty 3,44) v mobilní fázi 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0.



Obr. 18 Chromatogram enantioseparace FMOC-D/L-Ala na koloně **A)** Chirobiotic T, **B)** Chirobiotic T2, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: FMOC-L-Ala, 2: FMOC-D-Ala, *: derivatizační činidlo.

Z porovnání hodnot chromatografických parametrů získaných na kolonách Chirobiotic T2 a Chirobiotic TAG (tab. 15 vs. tab. 16) v mobilních fázích o stejném složení vyplývá, že retence všech analytů byla delší na koloně s navázaným teikoplanin aglykonovým chirálním selektorem. Oproti tomu u analytů, u kterých lze porovnat hodnoty enantiozlišení získané za identických separačních podmínek na obou kolonách, je patrné, že CSP na bázi teikoplanin aglykonu poskytovala (až na výjimku) nižší nebo velmi podobné hodnoty enantiozlišení a enantioselektivity než CSP s vyšším obsahem navázaného teikoplaninu. Výjimkou byl derivát FMOC-D/L-Val, u kterého v mobilní fázi s 50 obj. % methanolu o hodnotě pH pufru 6,0 vedla změna typu chirální stacionární fáze ke zlepšení enantioseparace a enantiozlišení vzrostlo z hodnoty 1,01 na 1,59 (obr. 19).



Obr. 19 Chromatogram enantioseparace Fmoc-D/L-Val na koloně **A)** Chirobiotic T2, **B)** Chirobiotic TAG, mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 50/50 (v/v), průtoková rychlost 0,7 ml/min, fluorescenční detekce při vlnové délce excitace 254 nm a vlnové délce emise 314 nm, označení: 1: Fmoc-L-Val, 2: Fmoc-D-Val, *: derivatizační činidlo.

5. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu RP-HPLC pro enantioseparaci aminokyselin (alaninu, valinu, leucinu a isoleucinu) v derivatizované podobě za účelem vzájemné separace derivátů D-forem ve směsi s využitím komerčně dostupných kolon na bázi glykopeptidů, resp. Chirobiotic T, T2 a TAG. Derivatizace byla provedena fluorescenčním derivatizačním činidlem 9-fluorenylmethylchloromravenčanem (FMOCCl).

Na koloně Chirobiotic T obsahující teikoplanin navázaný na silikagelovém nosiči byly nejprve provedeny separace nederivatizovaných aminokyselin za UV detekce při 205 nm v binární mobilní fázi o složení methanol/voda. Obsah organického modifikátoru se pohyboval v rozmezí 40 – 70 obj. %. Byl sledován vliv složení mobilní fáze na průběh enantioseparace aminokyselin. V každé z testovaných mobilních fází bylo dosaženo úplné separace L- a D-enantiomerů, až na základní linii s vysokými hodnotami enantiorozlišení. Posléze byly studované aminokyseliny za účelem zvýšení citlivosti detekce derivatizovány pomocí činidla FMOCCl. Separace derivatizovaných aminokyselin byly provedeny za UV detekce při 262 nm opět v mobilní fázi methanol/voda přičemž obsah organického modifikátoru se pohyboval v rozmezí 30 – 70 obj. %. V každé z testovaných mobilních fází nebyl pozorován ani náznak enantioseparace a retence analytů byla velmi krátká. Z tohoto důvodu bylo optimalizováno složení mobilní fáze a přistoupeno k záměně vody za 0,5% vodný roztok triethylamoniumoctanový pufr o hodnotách pH 4,0; 5,0 a 6,0. V nepufrované a pufrované mobilní fázi o stejném zastoupení methanolu vedla záměna vody za 0,5% TEAA pufr o různém pH k prodloužení retence u všech analytů. Na hodnoty enantiorozlišení měla záměna vody pufrům výrazný vliv. V každé proměřované mobilní fázi docházelo k úplné chirální diskriminaci všech derivatizovaných aminokyselin až na základní linii. Z výsledků separací získaných za UV detekce při 262 nm vyplynulo, že jako nejvhodnější pufrovaná mobilní fáze pro sledování průběhu derivatizace s již fluorimetrickou detekcí, byla mobilní fáze o složení MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v).

Při optimalizaci derivatizačního postupu s využitím fluorimetrické detekce ($\lambda_{\text{Ex}} = 254 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 314 \text{ nm}$) byly na koloně Chirobiotic T za vhodně zvolených

koncentrací aminokyseliny a derivatizačního činidla proměřeny různé vzájemné objemové poměry. Jako nejvhodnější objemový poměr pro následné chirální separace byl vybrán poměr 1/1 D/L-aminokyselina/FMOC-Cl, kdy koncentrace derivatizačního činidla byla oproti koncentraci aminokyseliny desetkrát vyšší.

V rámci optimalizace podmínek pro enantioseparaci FMOC-D/L-aminokyselin byly za vybraných podmínek derivatizace studovány binární mobilní fáze tvořené methanolem jako organickým modifikátorem a vodnou složkou s využitím CSP na bázi glykopeptidových makrocyclických antibiotik. Byl sledován jak vliv obsahu methanolu, tak i složení vodné složky mobilní fáze na vybrané chromatografické parametry. Postupně byly na kolonách Chirobiotic T a Chirobiotic T2 proměřeny mobilní fáze MeOH/0,5% TEAA pufr při obsahu methanolu 40 a 50 obj. % a hodnot pH vodné složky v rozsahu 4,0 – 6,5. Na koloně Chirobiotic TAG byl proměřen stejný typ mobilní fáze s tím rozdílem, že obsah organického modifikátoru se pohyboval v rozmezí 40 – 55 obj. % a hodnoty pH pufru byly v rozsahu 4,0 – 7,0.

Na všech kolonách bylo ve zvolených separačních systémech eluční pořadí derivátů enantiomerů aminokyselin vždy stejné a to takové, že deriváty L-enantiomerů vždy eluovaly před jejich D-analogy. Změnami složení mobilní fáze docházelo na daných kolonách k záměně retenčního pořadí jednotlivých derivátů L- či D-aminokyselin. Nejkratší retence analytů a nejvyšších hodnot enantiorozlišení a enantioselektivity bylo ve zvolených separačních systémech jednoznačně dosaženo na koloně Chirobiotic T. Naopak kolona Chirobiotic TAG poskytovala ze všech kolon retence nejdelší. Z porovnání dosažených výsledků při enantioseparacích na kolonách Chirobiotic T2 a Chirobiotic TAG vyplynulo, že tyto dvě kolony poskytovaly ve zvolených separačních systémech (až na výjimku) podobné hodnoty enantiorozlišení a enantioselektivity. V případě kolony Chirobiotic TAG u některých separací byly tyto hodnoty dokonce nižší. V každé testované mobilní fázi o různé hodnotě pH vodné složky měl pokles obsahu methanolu za následek nárůst retence u všech analytů. Stoupající retence vyvolaná poklesem obsahu organického modifikátoru byla na koloně Chirobiotic T doprovázena zvyšující se hodnotou enantiorozlišení a mírně vzrůstající enantioselektivitou. U kolon Chirobiotic T2 a Chirobiotic TAG byla stoupající retence doprovázena (s výjimkami) poklesem či neměnným enantiorozlišením a prakticky neměnnou enantioselektivitou. Vliv různé hodnoty pH 0,5% TEAA pufru na retenci

derivátů L-enantiomerů v mobilních fázích o proměřovaných koncentracích methanolu byl na všech kolonách prakticky stejný. S rostoucím pH vodné složky docházelo ke zkracování jejich retence (s výjimkou pH 6,5 na koloně Chirobiotic T2). Vliv různé hodnoty pH pufru na retenci derivátů D-enantiomerů byl na každé koloně jiný. Na všech kolonách bylo (opět až na výjimky) dosaženo vyšších hodnot enantiozlišení při vyšších hodnotách pH pufru.

Na koloně Chitobiotic T byla jako nejvhodnější mobilní fáze pro enantioseparaci všech jednotlivých a směsi tří (D/L-Ala, D/L-Val, D/L-Leu) derivatizovaných aminokyselin vybrána mobilní fáze 40/60 (v/v) MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 6,0. Za takto optimalizovaných separačních podmínek byly proměřeny kalibrační závislosti plochy i výšky píků na koncentraci analytu, jak pro jednotlivé FMOC-L-enantiomery a FMOC-D-enantiomery aminokyselin, tak i pro FMOC-D-enantiomery ve směsi tří derivatizovaných aminokyselin. Výsledkem kvantifikace jednotlivých derivátů L- a D-enantiomerů byly určené limity detekce, které se pohybovaly v rozmezí 1,9 – 2,5 ng/ml (pro deriváty L-enantiomerů) a 7,5 – 21,0 ng/ml (pro deriváty D-enantiomerů). Při kvantifikaci derivátů D-enantiomerů ve směsi tří FMOC-D/L-aminokyselin se limity detekce pohybovaly v rozmezí 11,3 – 27,9 ng/ml.

Pro zlepšení vzájemné separace derivátů D-enantiomerů ve směsi všech studovaných FMOC-D/L-aminokyselin byl 0,5% TEAA pufr o pH 6,0 zaměněn za 1% TEAA pufr o pH 6,0. Zvýšení koncentrace pufru o totožném pH vedlo k nárůstu retence u všech analytů. Po optimalizaci složení byla jako nejvhodnější mobilní fáze pro enantioseparaci všech čtyřech derivatizovaných aminokyselin vybrána fáze o složení 38/62 (v/v) MeOH/1% TEAA pufr, pH 6,0. Za takto optimalizovaných separačních podmínek byly pro deriváty D-enantiomerů proměřeny kalibrační závislosti plochy i výšky píků na koncentraci. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 17,9 – 76,1 ng/ml.

Na koloně Chirobiotic TAG byla jako nejvhodnější mobilní fáze pro enantioseparaci pouze tří jednotlivých derivatizovaných aminokyselin (D/L-Val, D/L-Leu a D/L-Ile) vybrána fáze o složení MeOH/0,5% TEAA pufr, pH 7,0 55/45 (v/v). V tomto optimalizovaném složení mobilní fáze byla provedena kvantifikace jednotlivých derivátů L- a D-enantiomerů. Vypočtené limity detekce se pro deriváty L-enantiomerů pohybovaly v rozmezí 2,8 – 4,6 ng/ml, zatímco u derivátů D-enantiomerů byly v rozsahu 5,2 – 8,4 ng/ml.

Ze všech tří typů proměřovaných komerčně dostupných CSP na bázi glykopeptidových makrocyclických antibiotik byla pro enantioseparaci aminokyselin derivatizovaných činidlem 9-flourenylmethylchloromravenčanem (FMOC-Cl) za zvolených separačních podmínek nejvhodnější kolona Chirobiotic T umožňující, jak úplné vzájemné odseparování derivátů D-Val, D-Ala a D-Leu ve směsi, tak i alespoň velmi zdařilé částečné odseparování všech derivátů D-forem studovaných aminokyselin ve směsi. Na kolonách Chirobiotic T2 a Chirobiotic TAG nebylo v žádném z testovaných separačních systémů nalezeno takové složení mobilní fáze, které by zajistilo alespoň částečnou vzájemnou separaci třech derivátů D-forem studovaných aminokyselin v ještě akceptovatelné době analýzy.

POUŽITÁ LITERATURA

1. Červinka, O.: *Chem. Listy* 93, 294 (1999).
2. Kroutil, J.: *Analýza chirálních sloučenin* (Tesařová, E.; ed.), kap. 1. Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
3. Caldwell, J.; Wainer, I. W.: *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 16, 105 (2001).
4. Loukotková, L.; Rambousková, M.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Chirality* 20, 900 (2008).
5. Eliel, E. L.: *Stereochemie uhlíkatých sloučenin*, překlad z angličtiny, Academia, Praha, 1970.
6. Caldwell, J.: *J. Chromatogr. A* 719, 3 (1996).
7. Tesařová, E.; Armstrong D. W., v knize: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences* (Deyl, Z.; ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 1998.
8. Fassihi, A.R.: *Int. J. Pharm.* 92, 1 (1993).
9. Jamali, F.; Mehvar, R.; Pasutto, F.M.: *J. Pharm. Sci.* 78, 695 (1989).
10. Knocke, B.; Blaschke, G.: *J. Chromatogr. A* 666, 235 (1994).
11. Wallworth, D. M.; Lee, J. T., v knize: *Handbook of Analytical Separation*, vol. 4. *Bioanalytical Separation* (Wilson, I. D.; ed.), kap. 5. Elsevier, Amsterdam 2003.
12. Davankov, V. A.: *Pure & App/. Chem.* 69, 1469 (1997).
13. Dimitrova, P.; Bart, H. J.: *Chem. Biochem. Eng.* 24, 75 (2010).
14. Tesařová, E.: *Analýza chirálních sloučenin* (Tesařová, E.; ed.), kap. 2 a 4. Pražské analytické centrum inovací, Praha 2007.
15. Štulík, K. a kol: *Analytické separační metody*, Univerzita Karlova v Praze, Karolinum, Praha 2004.
16. Nuggehally, R. S.; Igwemezie, L. N.: *Biomed. Chromatogr.* 6, 163 (1992).
17. Nuggehally, R. S.: *Biomed. Chromatogr.* 18, 207 (2004).
18. Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 59, 84 (1987).
19. Ali, I.; Kumerer, K.; Aboul-Enein, H. Y.: *Chromatographia* 63, 295 (2006).
20. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A.: *J. Sep. Sci.* 29, 1305 (2006).
21. Somma, S.; Gastaldo, L.; Corti, A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 26, 917 (1984).

22. Barry, A. L.; Thornsberry, C.; Jones, R. N.: *J. Clin. Microbiol.* 23, 100 (1986).
23. Berthod, A.; Chen, X.; Kullman, J. P.; Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 72, 1767 (2000).
24. Armstrong, D. W.; Tang, Y.; Chen, S.; Zhou, Y.; Bagwill, Ch.; Chen, J.R.: *Anal. Chem.* 66, 1473 (1994).
25. Aboul-Enein, H. Y.; Ali, I.: *Chromatographia* 52, 679 (2000).
26. Armstrong, D. W.; Nair, U. B.: *Electrophoresis* 18, 2331 (1997).
27. Ward, T. J.; Farris, A. B.: *J. Chromatogr. A* 906, 73 (2001).
28. D'Acquarica, I.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 3 (2000).
29. Chang, S. C.; Reid, G. L.; Chen, S.; Chang, C. D.; Armstrong, D. W.: *Trends in Analytical Chemistry* 12, 144 (1993).
30. Xiao, T. L.; Armstrong, D. W., v knize: *Methods in Molecular Biology*, vol. 243. *Chiral separations: methods and protocols* (Gübitz, G.; Schmid, M.G.; ed.), kap. 4. Humana Press Inc., Totowa 2004.
31. Hroboňová, K.; Lehotay, J.; Čižmáriková, R.; Armstrong, D.W.: *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 24, 2225, (2001).
32. Ekborg-Ott, K. H.; Kullman, J. P.; Wang, X.; Gahm, K.; He, L.; Armstrong, D. W.: *Chirality* 10, 627 (1998).
33. Parenti, F.; Beretta, G.; Berti, M.; Arioli, V.: *J. Antibiot.* 31, 276 (1978).
34. Gasper, M. P.; Berthod, A.; Nair, U. B.; Armstrong, D. W.: *Anal. Chem.* 68, 2501, (1996).
35. Berthod, A.; Liu, Y.; Bagwill, Ch.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 731, 123 (1996).
36. Ekborg-Ott, K. H.; Liu, Y.; Armstrong, D. W.: *Chirality* 10, 434 (1998).
37. Honetschlägerová-Vadinská, M.; Srkalová, S.; Bosáková, Z.; Coufal, P.; Tesařová, E.: *J. Sep. Sci.* 32, 1704 (2009).
38. Tesařová, E.; Bosáková, Z.; Pacáková, V.: *J. Chromatogr. A* 838, 121 (1999).
39. Péter, A.; Török, R.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 1057, 229 (2004).
40. Berthod, A.; Xiao, T. L.; Liu, Y.; Jenks, W. S.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* 955, 53 (2002).
41. Xiao, T. L.; Rozhkov, R. V.; Larock, R. C.; Armstrong, D. W.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 639 (2003).

42. Berkrucz, R.; Ilisz, I.; Forro, E.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.; Péter, A.: *Chromatographia Supplement 63*, 29 (2006).
43. Evans, D. A.; Katz, J. L.; Peterson, G. S.; Hinterman, T.: *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 12413 (2001).
44. Péter, A.; Árki, A.; Tourwé, D.; Forró, E.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.: *J. Chromatogr. A* *1031*, 159 (2004).
45. Pataj, Z.; Ilisz, I.; Berkecz, R.; Misicka, A.; Tymecka, D.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.; Péter, A.: *J. Sep. Sci.* *31*, 3688 (2008).
46. Ilisz, I.; Ballet, S.; Rompaey, K. V.; Wachter, R. D.; Tourw, D.; Armstrong, D. W.; Péter, A.: *J. Sep. Sci.* *30*, 1881 (2007).
47. Sztojkov-Ivanov, A.; Fülöp, F.; Armstrong, D. W.; Péter, A.: *Chromatographia* *64*, 89 (2006).
48. Matsumura, S.; Kataoka, H.; Makita, M.: *Biomed. Chromatogr.* *9*, 205 (1995).
49. Deyl, Z.; Mikšík, I.; Tesařová, E., v knize: *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences* (Deyl, Z.; ed.), kap. 4. Elsevier, Amsterdam 1998.
50. Koller, M.; Eckert, H.: *Anal. Chim. Acta* *352*, 31 (1997).
51. Aromdee, Ch.; Fawcett, J. P.; Ledger, R.: *J. Chromatogr. B* *677*, 313 (1996).
52. Merali, S.; Clarkson, A. B.: *J. Chromatogr. B* *675*, 321 (1996).
53. Vakily, M.; Jamali, F.: *J. Pharm. Sci.* *85*, 638 (1996).
54. Bhushan, R.; Dubey, R.: *J. Chromatogr. A* *1218*, 3648 (2011).
55. Allenmark, S.; Skogsberg, U.; Thunberg, L.: *Tetrahedron: Asymmetry* *11*, 3527 (2000).
56. Goto, J.; Shao, G.; Fukasawa, M.; Nambara, T.; Miyano, S.: *Anal. Sci.* *7*, 645 (1991).
57. Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W.: *J. Chromatogr. A* *906*, 3 (2001).
58. Marchelli, R.; Dossena, A.; Palla, G.: *Trends Food Sci. Technol.* *7*, 113 (1996).
59. Srkalová, S.; Kalíková, K.; Tesařová, E.: *Chem. Listy* *102*, 480 (2008).
60. Sajdok, J.; Kozak, A.; Zídková, J.; Kotrba, P.; Pilin, A.; Káš, J.: *Chem. Listy.* *95*, 98 (2001).
61. Friedman, M.: *J. Agric. Food Chem.* *47*, 3457 (1999).
62. Liardon, R.; Ledermann, S.: *J. Agric. Food Chem.* *34*, 557 (1986).

63. Csapó, J.; Varga-Visi, E.; Lóki, K.; Albert, C.; Salamon, S.: *Amino Acids* 34, 287 (2008).
64. Casal, S.; Alves, M. R.; Mendes, E.; Oliveira, M. B. P. P.; Ferreira, M. A.: *J. Agric. Food Chem.* 51, 6495 (2003).
65. Perkins, H. R.: *Bacteriol. Rev.* 27, 18 (1963).
66. Jin, D.; Miyahara, T.; Oe, T.; Toyo'oka, T.: *Anal. Biochem.* 269, 124 (1999).
67. Csapó, J.; Schmidt, J.; Csapó-Kiss, Z.; Varga-Visi, É.; Pohn, G.; Csokona, É.: *Chromatographia Supplement* 56, 169 (2002).
68. Rubio-Barroso, S.; Santos-Delgado, M. J.; Martín-Olivar, C.; Polo-Díez, L. M.: *J. Dairy Sci.* 89, 82 (2006).
69. Csapó, J.; Csapó-Kiss, Z.; Stefler, J.: *J. Dairy Sci.* 78, 2375 (1995).
70. Simó, C.; Barbas, C.; Cifuentes, A.: *Electrophoresis* 24, 2431 (2003).
71. Simó, C.; Barbas, C.; Cifuentes, A.: *J. Agric. Food Chem.* 50, 5288 (2002).
72. Brückner, H.; Langer, M.; Lüpke, M.; Westhauser, T.; Godel, H.: *J. Chromatogr. A* 697, 229 (1995).
73. Srkalová, S.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2008.
74. Boniglia, C.; Carratu, B.; Sanzini, E.: *J. Food Sci.* 67, 1352 (2002).
75. Zahradníčková, H.; Hartvich, P.; Šimek, P.; Hušek, P.: *Amino acids* 35, 445 (2008).
76. Chang, H. M.; Tsai, Ch. F.; Li, Ch. F.: *J. Agric. Food Chem.* 46, 4598 (1998).
77. Bhushan, R.; Joshi, S.: *Biomed. Chromatogr.* 7, 235 (1993).
78. Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, 1 (2008).
79. Molnár-Perl, I.: *J. Chromatogr. B* 879, 1241 (2011).
80. Fitznar, H. P.; Lobbes, J. M.; Kattner, G.: *J. Chromatogr. A* 832, 123 (1999).
81. Jegorov, A.; Tříška, J.; Trnka, T.: *J. Chromatogr. A* 673, 286 (1994).
82. Bhushan, R.; Kumar, V.: *J. Chromatogr. A* 1201, 35 (2008).
83. Harada, K.; Fujii, K.; Mayumi, T.; Hibino, Y.; Suzuki, M.: *Tetrahedron Letters*, 36, 1515 (1995).
84. Chen, S.: *Biomed. Chromatogr* 20, 718 (2006)
85. Chen, S.: *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26, 3475 (2003).
86. Chen, S.: *Amino Acids* 26, 291 (2004).

87. Gustavsson, B.; Betnér, I.: *Journal of Chromatography* 507, 67 (1990).
88. Jámboř, A.; Molnár-Perl, I.: *J. Chromatogr. A* 1216, 3064 (2009).
89. Li, Y. H.; Lee, W.: *J. Sep. Sci.* 28, 2057 (2005).
90. Lide, D. R.; ed.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 89th Edition, Boca Raton, CRC Press 2008.
91. Rozumová, N.: *Bakalářská práce*, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Praha 2010.
92. Bank, R. A.; Jansen, E. J.; Beekman, B.; Koppele, J. M.: *Anal. Biochem.* 240, 167 (1996).