

## ORIGINAL ARTICLE

# Separácia enantiomérov fenylalanínu a metionínu metódou HPLC: porovnanie typov stacionárnych fáz

## Separation of phenylalanine and methionine enantiomers by HPLC method: a comparison of stationary phase types

Katarína Hroboňová • Anna Lomenova • Jozef Čižmárik • Jozef Lehota

Došlo: 14. marca 2017 / Prijato: 11. apríla 2017

### Súhrn

Témou práce je enantioselektívna separácia vybraných aminokyselín metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie. Separácia enantiomérnych form bola testovaná pomocou chirálnych stacionárnych fáz na základe  $\beta$ -cyklodextrínu, izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 a makrocyclického antibiotika teikoplanínu. Najúčinnejšia enantioseparácia sa dosiahla na teikoplanínovej chirálnej stacionárnej fáze v separačnom systéme s obrátenými fázami. UV spektrofotometrická detekcia pri vlnovej dĺžke 210 nm bola použitá na detekciu aminokyselín. Na hodnotenie vhodnosti HPLC metódy sa použili linearita, medza detekcie, medza stanovenia, presnosť a výťažnosť. Medzastanoviteľnosti pre enantioméry fenylalanínu a metionínu boli 0,3 a 0,2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . HPLC metóda s použitím chirálnej stacionárnej fázy na základe teikolanína bola aplikovaná na analýzu doplnkov výživy.

**Kľúčové slová:** separácia enantiomérov • HPLC • fenylalanín • metionín

### Summary

The paper deals with enantioselective separation of amino acids by the high performance liquid chromatography method. Separations of enantiomeric forms were tested on the chiral stationary phases based on  $\beta$ -cyclodextrine, isopropyl carbamate cyclofructan 6, and the macrocyclic

antibiotic teicoplanin. The best enantioseparation was obtained on the teicoplanin-based chiral stationary phase in the reversed-phase mode. UV spectrophotometric detection at 210 nm was used for detection of amino acids. The method was validated with respect to linearity, precision, limit of detection, limit of quantitation, and recovery. Limits of quantitation for phenylalanine and methionine enantiomers were 0.3 and 0.2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectively. The HPLC method with teicoplanin-based chiral stationary phase was applied for analysis of dietary supplements.

**Key words:** separation of enantiomers • HPLC • phenylalanine • methionine

### Úvod

Aminokyseliny predstavujú dôležitú skupinu chirálnych organických zlúčenín. Sú základnými stavebnými jednotkami proteínov a zúčastňujú sa mnohých biologických procesov. Slúžia ako neurotransmitéry a prekurzory pre syntézu hormónov a iných látok, majú funkciu antioxidantov a sú stabilizátormi DNA a RNA<sup>1)</sup>. V organizmoch sa vyskytujú väčšinou v L-enantiomérnej forme (homochiralita), čo môže byť v dôsledku rozdielnej stability oboch enantiomérov. Prírodný výskyt D-aminokyselín je zriedkavý a môže súvisieť so špecifickými procesmi<sup>2, 3)</sup>. Enantioméry aminokyselín sa môžu lísiť nielen v ich biologických účinkoch, ale aj ďalšími vlastnosťami, napr. chut'ou, rozpustnosťou<sup>4)</sup>. Zmena enantiomérneho pomeru je vhodným ukazovateľom spracovania, skladovania, životnosti a kvality, predovšetkým, potravinárskych výrobkov. Separácia enantiomérov aminokyselín má teda nezastupiteľné miesto v biochemickej, farmaceutickej a potravinárskej analýze.

Mnohé látky s výživovým alebo fyziologickým účinkom, vitamíny a minerálne látky dôležité pre správne fungovanie ľudského organizmu chýbajú v prirodzenej, aj keď pestrej strave, a preto je vhodné ich prísun doplniť formou výživových doplnkov. Fenylalanín a metionín sú esenciálne aminokyseliny, ktoré si ľudský organizmus nedokáže sám vytvoriť a ich prísun do organizmu sa dodávaná vo forme potravín, príp. iných doplnkov. Fenylalanín je prekurzorom pre tvorbu tyrozínu, katecho-

doc. Ing. Katarína Hroboňová, PhD. (✉) • A. Lomenova  
Ústav analytickej chémie  
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave  
Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika  
e-mail: katarina.hrobonova@stuba.sk

J. Čižmárik  
Katedra farmaceutickej chémie  
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Slovenská republika

J. Lehota  
Katedra chémie, Fakulta prírodných vied  
Univerzita Sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Slovenská republika

lamínov (dopamín, adrenalín, noradrenalin) a kožného pigmentu melanínu. Užívanie fenylalanínu má priaznivý vplyv na nervový systém a psychiku, potláča nadmernú chut' k jedlu, povzbudzuje mozgové tkanivo k tvorbe látok endorfínov a enkefálínov v centrálnej nervovej sústave, potláča činnosť enzýmov, ktoré tlmia činnosť endorfínov, čím predĺžuje ich pôsobenie, podporuje mentálnu bdelosť a pamäť<sup>5</sup>). Metionín sa v organizme podieľa na rozklade tukov a bráni ich ukladaniu v pečeni a cievach, podporuje funkcie tráviacej sústavy, detoxikuje od škodlivých látok, bráni lámavosti vlasov, je potrebný pri liečbe reumatickej horúčky, syntéze nukleových kyselín, kolagénu a bielkovín. Je zdrojom síry, ktorá deaktivuje voľné radikály. Metionín je účinný antioxidant<sup>6</sup>). Fenylalanín a metionín sú preto jednými z hlavných zložiek mnohých aminokyselinových doplnkov výživy.

Chromatografické metódy (HPLC, TLC, GC) sú vhodné na separáciu enantiomérov, a teda sa často využívajú na kontrolu procesov výroby, pri štúdiu interakcií optickejch izomérov s inými chirálnymi alebo nechirálnymi molekulami. Pri priamej HPLC separácii enantiomérov sa využívajú stacionárne fázy obsahujúce rôzne typy chirálnych selektorov. Separácia je založená na tvorbe prechodných diastereoisomérnych komplexov medzi enantiomérimi a stacionárnou fázou. Medzi najčastejšie chirálne selektory patria makrocyclické antibiotiká teikoplanín a teikoplanín aglykón<sup>7,8)</sup>, cyklodextríny, kruhové étery, deriváty polysacharidov a proteínov, cyklofruktány<sup>9,10)</sup>. Prítomnosť stereogénnych centier a heterogénnosť funkčných skupín v ich molekulách, ako aj zloženie mobilných fáz, má významný vplyv na stereoselektívne interakcie medzi enantiomérom a selektorm, ktoré sú zodpovedné za chirálne rozpoznávanie. Príklad aplikovateľnosti chirálnych stacionárnych fáz (CSF) na báze teikoplánu a separačných systémov v závislosti od typu separovaných zlúčenín dokumentuje tabuľka 1.

Cieľom práce bolo zvoliť vhodné podmienky (zloženie stacionárnej a mobilnej fázy) separácie enantiomérov vybraných esenciálnych aminokyselin pre ich následné stanovenie vo vzorkách výživových doplnkov metódou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie.

## Pokusná časť

### Chemikálie

DL-metionín, DL-fenylalanín, L-metionín a L-fenylalanín (> 98%) boli získané zo Sigma Aldrich. Acetonitril, metanol, (pre gradientovú HPLC), etanol, n-hexán (pre HPLC), kyselina octová (100 %), kyselina trifluorooctová, trietylamin (p.a.) boli získané z Merck. Na prípravu deionizovanej vody bolo použité zariadenie AquaMax ultra 370.

Vzorky výživových doplnkov s obsahom metionínu (vzorka 1) a fenylalanínu (vzorka 2) sa získali z obchodnej siete lekárni.

### HPLC podmienky

Kvapalinový chromatograf Agilent Technologies (séria 1100) pozostával z binárneho vysokotlakového čerpadla,

la, dávkovacieho ventilu Rheodyne, termostatu kolóny a spektrofotometrického detektora (chromatogramy boli zaznamenávané pri vlnovej dĺžke 210 nm). Na HPLC separáciu enantiomérov sa použili chirálne stacionárne fázy Chirobiotic T (chirálny selektor teikoplánu), IP-CF6 (chirálny selektor izopropylkarbamát cyklofruktánu 6) a Chiradex (chirálny selektor β-cyklodextrín, β-CD) (4 × 250 mm ID, 5 µm). Mobilné fázy tvorili zmesi: vodný roztok acetonitrilu (pre T a β-CD), n-hexán/etanol/kyselina trifluorooctová (pre IP-CF6 a β-CD) a metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (pre β-CD). Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml·min<sup>-1</sup> a dávkovaný objem 20 µl. Separácie sa uskutočnili pri teplote kolóny 0 °C.

### Pracovné postupy

Roztoky racemátov aminokyselín a L-enantomérnych foriem boli pripravené rozpustením látky v mobilnej fáze (koncentrácia 1 mg·ml<sup>-1</sup> a následne sa riedili na nižšie koncentrácie podľa potreby).

Vzorky sa spracovali kvapalinovou extrakciou: Obsah piatich kapsúl vzorky sa zhomogenizoval. Presne odvážené množstvo vzorky zodpovedajúce jednej kapsule (okolo 0,4 g vzorky 1; 0,3 g vzorky 2) sa zmiešalo s metanolom (20 ml pre vzorku 1, 100 ml pre vzorku 2), zmes sa miešala 30 min na laboratórnej miešačke pri teplote 23 °C a centrifugovala (5 min, 400 rpm). Extrakt bol prefiltrovaný cez 0,45 µm membránový filter a následne dávkovaný do HPLC. Extrakt vzorky 2 sa pred HPLC analýzou riedili 5-krát mobilnou fázou.

### Analytické parametre

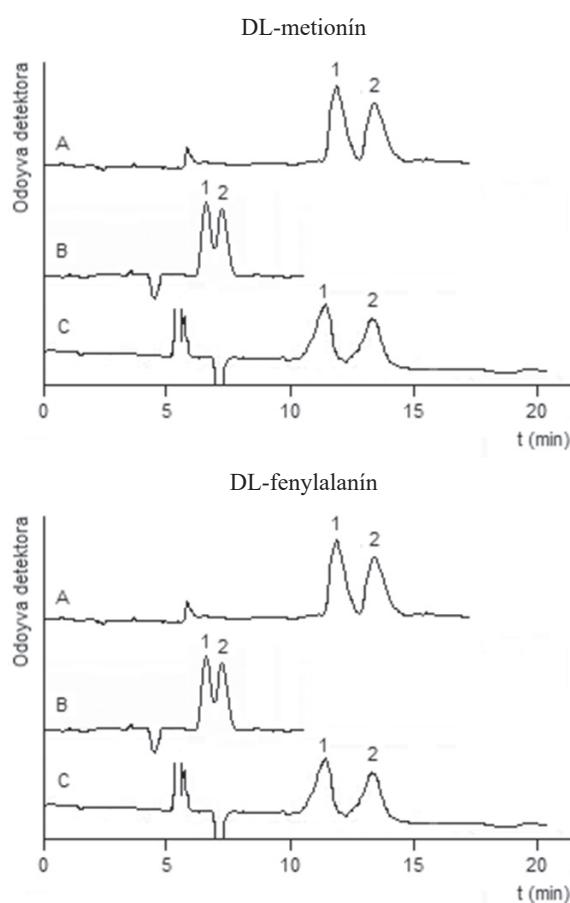
Na hodnotenie vhodnosti HPLC metódy sa použili parametre: linearita, medza detekcie, medza stanovenia, presnosť a výťažnosť.

Matricové kalibračné závislosti boli zostrojené v rozsahu koncentrácií 0,3–500 µg·ml<sup>-1</sup> pre enantioméry metionínu a 0,2–500 µg·ml<sup>-1</sup> pre enantioméry fenylalanínu (šesť kalibračných roztokov, 7-krát prípravené). Kalibračné roztoky boli dávkované 3-krát. Parametre kalibračných závislostí, závislosti plochy píku (y) enantioméru of koncentrácie (x, v µg·ml<sup>-1</sup>), dosahovali nasledovné hodnoty: y = 106,2x + 7,9 pre L-metionín; y = 112,5x + 6,4 pre D-metionín; y = 754,3x + 7,0 pre L-fenylalanín; y = 734,3x + 7,6 pre D-fenylalanín.

Medza stanovenia (LOQ) a medza detekcie (LOD) boli stanovené ako najnižšie koncentrácie kalibračných roztokov, ktoré je možné danou metódou detegovať (LOD) a stanoviť (LOQ) určené pre pomer odozvy plochy píku a šumu nulovej línie S/N = 3 a 10.

Vnútrodňová a medzidňová presnosť metódy boli hodnotené z opakovaných analýz vzoriek (7-krát prípravené) počas 1 dňa a počas 6 dní. Výsledky boli vyjadrené ako percentá relatívnej smerodajnej odchýlky.

Výťažnosť bola stanovená na troch úrovniach koncentrácií (20 mg·g<sup>-1</sup>, 143 mg·g<sup>-1</sup> a 357 mg·g<sup>-1</sup> pre D- a L-fenylalanín; 5 mg·g<sup>-1</sup>, 10 mg·g<sup>-1</sup> a 25 mg·g<sup>-1</sup> pre D- a L-metionín). Vzorky s prídavkom a bez prídavku boli spracované rovnakým postupom a výťažnosti boli vypočítané ako percentuálny rozdiel medzi plochami píkov.



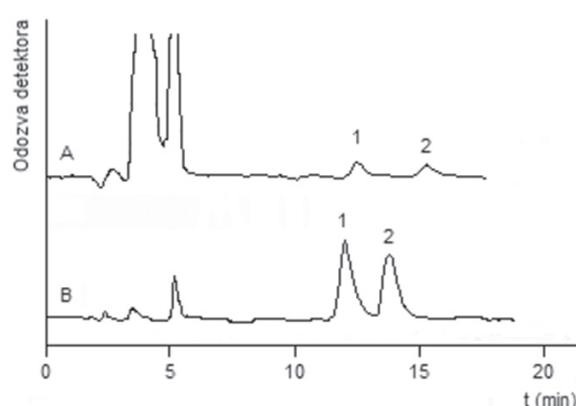
Obr. 1. Chromatografické záznamy separácie enantiomérov *D,L*-metionínu a *D,L*-fenylalanínu použitím testovaných chirálnych stacionárnych fáz

Chromatografické podmienky: (A) Chirobiotic T, mobilná fáza acetonitril/voda (75/25, v/v); (B) IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v); (C) IP-CF6, mobilná fáza n-hexán/etanol/kyselina trifluórooctová (50/50/0,1, v v/v); prietok mobilnej fázy: 0,8 ml.min<sup>-1</sup>; detektor: UV ( $\lambda = 210$  nm); teplota kolóny: 0 °C. A – vzorka s obsahom metionínu, B – vzorka s obsahom fenylalanínu  
1 – *L*-enantiomér, 2 – *D*-enantiomér

## Výsledky a diskusia

### Separácia enantiomérov aminokyselín

Na separáciu enantiomérov vybraných nederivatizovaných aminokyselín sa testovali stacionárne fázy s rôznymi chirálnymi selektormi, na základe cyklodextrínov, makrocyclických antibiotík a cyklofruktánov.



Obr. 2. Chromatogramy separácie extraktov testovaných vzoriek  
Chromatografické podmienky: Chirooptic T, mobilná fáza: acetonitril/voda (75/25, v/v); prietok mobilnej fázy: 0,8 ml.min<sup>-1</sup>; detektor: UV ( $\lambda = 210$  nm); teplota kolóny: 0 °C. A – vzorka s obsahom metionínu, B – vzorka s obsahom fenylalanínu  
1 – *L*-enantiomér, 2 – *D*-enantiomér

Separácia enantiomérov fenylalanínu a metionínu na  $\beta$ -cyklodextrínovej CSF sa testovala v polárno-organickom, obrátenom a konvenčnom separačnom systéme fáz. Čiastočná separácia enantiomérov metionínu a fenylalanínu ( $R_{ij} \sim 1,1$ ) sa dosiahla v konvenčnom separačnom systéme fáz, pri použití mobilnej fázy etanol/n-hexán/kyselina trifluórooctová (25/75/0,2 v/v/v). Účinnosť kolóny však bola nízka a uvedená stacionárna fáza ani v jednom s testovaných separačných usporiadani nebola vhodná na analýzu výživových doplnkov. Stacionárna fáza s  $\beta$ -cyklodextrínom ako chirálnym selektorom v separačnom systéme s obrátenými fázami je vhodnejšia na separáciu enantiomérov derivatizovaných (dansyl-, dinitrobenzoyl-, dabetyl-deriváty) aminokyselín<sup>13)</sup>.

Separácia enantiomérov vybraných nederivatizovaných aminokyselín na CSF na základe izopropylkarbamát cyklofructanu 6 sa testovala v polárno-organickom (zmes metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin ako mobilná fáza) a konvenčnom (zmes n-hexán/etanol/kyselina trifluórooctová ako mobilná fáza) separačnom systéme fáz. V systéme s polárno-organickým usporiadáním fáz sa so zvyšovaním koncentrácie organického modifikátora, metanolu, v mobilnej fáze od 20 do 85 % znižovali hodnoty retenčných faktorov a rozlíšenia. Separácia enantiomérov metionínu a fenylalanínu sa dosiahla pri elúcií mobilnou fázou metanol/acetonitril/

Tab. 1. Aplikovateľnosť chirálnych stacionárnych fáz na základe teikoplanínu pre HPLC separáciu enantiomérov rôznych typov látok<sup>7, 11, 12)</sup>

Typ separovanej látky	HPLC separačný systém (typ mobilnej fázy)
polárne/ionizovateľné	PI (metanol/kyselina/zásada)
neutrálne	NP (polárne/nepolárne organické rozpúšťadlo)
neutrálne/polárne	PO (polárne organické rozpúšťadlo)
všetky typy	RP (organické/vodné rozpúšťadlo, tlivý roztok)

PI – polárno-iónový separačný systém, NP – separačný systém s konvenčným usporiadaním fáz, PO – polárno-organický separačný systém, RP – separačný systém s obráteným usporiadaním fáz

Tab. 2. Chromatografické charakteristiky a medze detekcie pre separáciu enantiomérov metionínu a fenylalanínu na rôznych chirálnych stacionárnych fázach

CSF	Separačný systém	Mobilná fáza	D,L-metionín			LOD (µg.ml <sup>-1</sup> )	D,L-fenylalanín			LOD (µg.ml <sup>-1</sup> )
			R <sub>ij</sub>	k <sub>1</sub>	α		R <sub>ij</sub>	k <sub>1</sub>	α	
T	RP	a	3,0	1,3	1,5	0,1/0,1	1,6	0,9	1,3	0,05/0,06
β-CD	NP	b	1,1	4,1	1,2	10/10	1,1	4,2	1,2	—
IP-CF6	PO	c	1,0	0,7	1,2	5/5	0,7	0,4	1,1	0,8/0,8
IP-CF6	NP	d	1,1	4,6	1,3	5/5	1,2	2,5	1,3	1/1

CSF – chirálna stacionárna fáza, T – teikoplanín, IP-CF6 – izopropylkarbamát cyklofruktánu 6, β-CD – β-cykloidextrín, RP – separačný systém s obráteným usporiadaním fáz, NP – separačný systém s konvenčným usporiadaním fáz, PO – polárno-organický separačný systém, R<sub>ij</sub> – rozlišenie, k<sub>1</sub> – retenčný faktor enantioméru, ktorý eluuje z chromatografickej kolóny ako prvý, α – selektívny koeficient, LOD – medza detekcie (pre L-enantiomér/D-enantiomér), a – acetonitril/voda (75/25 v/v), 0 °C; b – etanol/n-hexán/kyselina trifluórooctová (25/75/0,2 v/v), 0 °C; c – metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2 v/v/v), 0 °C; d – etanol/n-hexán/kyselina trifluorooctová (60/40/0,1 v/v/v), 0 °C; RSD(k) ≤ 3,2 %, n = 3

Tab. 3. Validačné parametre HPLC metódy pre stanovenie enantiomérov metionínu a fenylalanínu

Parameter	L-metionín	D-metionín	L-fenylalanín	D-fenylalanín
linearita (µg.ml <sup>-1</sup> )	0,3–500 r <sup>2</sup> = 0,999	0,3–500 r <sup>2</sup> = 0,998	0,2–500 r <sup>2</sup> = 0,989	0,2–500 r <sup>2</sup> = 0,995
LOD (µg.ml <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,05	0,06
LOQ (µg.ml <sup>-1</sup> )	0,3	0,3	0,2	0,2
presnosť (RSD %) vnútrodňová medzidňová	5,5 8,3	6,7 7,1	5,8 8,2	4,3 7,9
výťažnosť (%) C1 C2 C3	97,6 98,1 97,1	98,2 97,5 94,8	98,5 96,1 96,8	98,2 95,8 96,6

LOQ – medza stanovenia, LOQ – medza detekcie, C1 – 20 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-fenylalanín, 5 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-metionín, C2 – 143 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-fenylalanín, 10 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-metionín, C3 – 357 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-fenylalanín, 25 mg.g<sup>-1</sup> pre D- a L-metionín

kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2 v/v/v). Hodnota rozlišovacieho faktora bola 1,0 pre D- a L-metionín a 0,7 pre D- a L-fenylalanín. Pri priamej enantioseparácii vybraných aminokyselín na izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 CSF v systéme s konvenčným usporiadaním fáz sa zvýšená retencia a selektivita pozorovali, keď mobilná fáza obsahovala menej ako 50% etanolu. Zvyšujúca sa koncentrácia etanolu mala za následok zhoršenie účinnosti enantioseparácie (zníženie hodnôt rozlíšenia enantiomérov). Vhodnou mobilnou fázou na separáciu enantiomérov D,L-metionínu a D,L-fenylalanínu bola zmes n-hexán/etanol/kyselina trifluórooctová (50/50/0,1 v/v/v), pri ktorej hodnoty rozlišovacích faktorov boli 1,1 a 1,2.

Separácia na CSF na báze teikoplanínu bola uskutočnená v separačnom systéme s obrátenými fázami, s mobilnou fázou acetonitril-voda. Testovali sa mobilné fázy, ktorých zloženie sa menilo v rozsahu od 30 do 90 obj. % organického modifikátora, acetonitrilu. Závislosť hodnôt retenčných faktorov D-, L-metionínu a D-, L-fenylalanínu od zloženia mobilnej fázy mali od 30–45 % acetonitrilu klesajúci charakter a od 45–90 % stúpajúci charakter. Hodnoty rozlíšenia enantiomérov metionínu a fenylalanínu v závislosti od zloženia mobilnej fázy mali podobný trend ako hodnoty retenčných faktorov. Z experimentálnych výsledkov vyplynulo, že najvhodnejšou mobilnou fázou na separáciu enantiomérov vybraných aminokyse-

lín bola zmes acetonitril/voda (75/25 v/v). Hodnoty rozlišovacieho faktora boli 1,6 pre D- a L-fenylalanín a 3,0 pre D- a L-metionín.

#### Porovnanie metód stanovenia aminokyselín

Typy CSF testovaných pre separáciu enantiomérov metionínu a fenylalanínu, typy separačných systémov a chromatografické charakteristiky získané pri najvhodnejších chromatografických podmienkach sú zhrnuté v tabuľke 2. Chromatografické záznamy enantioseparácie D,L-metionínu a D,L-fenylalanínu na testovaných CSF dokumentuje obrázok 1. Z porovnania chromatografických charakteristík vyplýva, že najúčinnejšia enantioseparácia (najvyššie hodnoty rozlíšenia enantiomérov) sa dosiahla na použitím CSF na základe teikoplanínu, kde aj podľa očakávania boli výrazne nižšie medze detekcie v porovnaní s HPLC-UV metódou s CSF na základe izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 alebo β-cykloidextrínu (tab. 3). Zvolená HPLC metóda sa vyznačovala aj väčším lineárnym rozsahom.

#### Analýza doplnkov výživy s obsahom metionínu a fenylalanínu

Na stanovenie enantiomérov vybraných aminokyselín vo vzorkách doplnkov výživy sa použila HPLC metóda s CSF na základe teikoplanínu v separačnom systéme s obrátenými fázami a so spektrofotometrickou detek-

ciou. Na hodnotenie vhodnosti metódy sa použili parametre, linearita, medza detekcie, medza stanovenia, presnosť a výťažnosť. Pre testované analyty bola výťažnosť viac ako 94 % ( $RSD < 10\%$ ) (tab. 3). Výsledky dokumentujú, že výťažnosť v uvedenom koncentračnom rozsahu nezávisela od koncentrácie analytov.

Výživový doplnok s obsahom D,L-metionínu (vzorka 1) je doporučený užívať na podporu rastu nechtorov a vlasov. Výsledky ukázali, že testovaný výživový doplnok, tak ako uvádza výrobca, obsahuje zmes enantiomérov metionínu (obr. 2). Ďalšimi zložkami výživového doplnku boli L-cystein, vitamíny a iné stopové prvky, ktoré pri použitých separačných podmienkach neinterferovali so žiadoucou z enantiomérnych foriem metionínu. V jednej kapsule vzorky 1 sa nachádza 47,5 mg L-metionínu a 46,2 mg D-metionínu ( $RSD 5\%$ ). Doplnok výživiv s obsahom fenylalanínu (vzorka 2) je doporučené používať na zlepšenie pamäti a pri mentálnej únavi. Kvantitatívnu analýzu sa zistilo, že v jednej kapsule vzorky 2 sa nachádza 178,1 mg L-fenylalanínu a 177,9 mg D-fenylalanínu ( $RSD 7\%$ ). Testovaná vzorka výživového doplnku obsahuje zmes enantiomérov, čo dokumentuje obrázok 2. Ďalšie zložky výživového doplnku, pri použitých separačných podmienkach, neinterferovali s enantiomérmi formami fenylalanínu.

## Záver

Aminokyseliny patria medzi jednu z najdôležitejších skupín biologicky aktívnych látok. HPLC enantioseparácia nederivatizovaných aminokyselin sa dosiahla použitím chirálnej stacionárnej fázy na základe I. teikoplanínu v systéme s obrátenými fázami, II. izopropylkarbamát cyclofructánu 6 v systéme s polárno-organickým usporiadaním fáz a III. izopropylkarbamát cyclofructánu 6 v systéme s konvenčným usporiadaním fáz. HPLC-UV metóda s teikoplanínovou CSF sa využila pri analýze vzoriek výživových prípravkov s obsahom D,L-metionínu a D,L-fenylalanínu.

## Poděkovanie

Práca vznikla za podpory grantu APVV-15-0355 Agentúry na podporu výskumu a vývoja Autori d'akujú prof. D.W. Armstrongovi za poskytnutie chirálnych stacionárnych fáz Chirobiotic T a IP-CF6.

**Stretnutí záujmov:** žiadny.

## Literatúra

- Guo M., Shi T., Duan Y., Zhu J., Li J., Cao Y. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Food. Compos. Anal.* 2015; 42, 84–90.
- Zahradníčková H., Haratvich P., Holoubek, I. Historie a význam chirálnych analýz aminokyselin v biologických matriciach a v životnom prostredí. *Chem. Listy*. 2005; 99, 703–710.
- Brückner H., Westhauser T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino acids* 2003; 24, 43–55.
- Shinitzky M., Nudelman F., Barda Y., Haimovitz R., Chen E., Dealer D. W. Unexpected differences between D- and L-thyrosine lead to chiral enhancement in racemic mixtures dedicated to the memory of Prof. Shneior Lifson – A great liberal thinker. *Orig. Life Evol. Biosphere* 2002; 32, 285–297.
- MacDermott A. J. Electroweak enantioselection and the origin of life. *Orig. Life Evol. Biosphere* 25 (1995) 191–199.
- Wu G. Amino Acids: Biochemistry and nutrition. Boca Raton: CRC Press 2013.
- Armstrong D. W., Youbang L., Ekborgott K. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations. *Chirality* 1995; 7, 474–497.
- Ilisz I., Berkecz R., Forró E., Fülop F., Armstrong D.W., Peter A. The role of  $\pi$ -acidic and  $\pi$ -basic chiral stationary phases in the high performance liquid chromatographic enantioseparation of unusual  $\beta$ -amino acids. *Chirality* 2009; 21, 339–348.
- Sun P., Armstrong D. W. Effective enantiomeric separations of racemic primary amines by the isopropyl carbamate – cyclofructan 6 chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217, 4904–4918.
- Moravčík J., Hroboňová K. Separácia enantiomérov aminokyselin metodou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie. *Čes. slov. Farm.* 2014; 63, 4–12.
- Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.-R. Macro cyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1994; 66, 1473–1484.
- Berthold A., Chen X., Kullman J. P., Armstrong D. W., Gasparrini F., D'Acquarica I., Villani C., Carotti A. Role of the carbohydrate moieties in chiral recognition on teicoplanin-based LC stationary phases. *Anal. Chem.* 2000; 72, 1767–1780.
- Lee S. H., Berthold A., Armstrong D. W. Systematic study on the resolution of derivatized amino acids enantiomers on different cyclodextrin-bonded stationar phases. *J. Chromatogr.* 1992; 603, 83–94.