

## 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 Lehotay

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

### Súhrn

Témou práce je enantioselektívna separácia vybraných aminokyselín metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Separácia enantiomérnych foriem bola testovaná pomocou chirálnych stacionárnych fáz na základe  $\beta$ -cyklodextrínu, izopropylkarbamát cyklofruktánu 6 a makrocyclického antibiotika teikoplanínu. Najúčinnnejšia 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. Medze stanoviteľnosti pre enantioméry fenylalanínu a metionínu boli 0,3 a 0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . HPLC metóda s použitím chirálnej stacionárnej fázy na základe teikoplanínu bola aplikovaná na analýzu doplnkov výživy.

**KLúčové 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  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 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-enantiomérovej 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 líšiť nielen v ich biologických účinkoch, ale aj ďalšími vlastnosťami, napr. chuťou, rozpustnosťou<sup>4)</sup>. Zmena enantioméroveho 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 dodáva vo forme potravín, príj. iných doplnkov. Fenylalanín je prekurzorom pre tvorbu tyrozínu, catecho-

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. Lehotay

Katedra chémie, Fakulta prírodných vied

Univerzita Sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Slovenská republika

lamínov (dopamín, adrenalín, noradrenalín) a kožného pigmentu melanínu. Užívanie fenylalanínu má priaznivý vplyv na nervový systém a psychiku, potláča nadmernú chuť k jedlu, povzbudzuje mozgové tkanivo k tvorbe látok endorfínov a enkefalinov v centrálnej nervovej sústave, potláča činnosť enzýmov, ktoré tlmia činnosť endorfínov, čím predlžuje 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 optických 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 diastereoizomérnych komplexov medzi enantiómami 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 enantiómom a selektorom, ktoré sú zodpovedné za chirálne rozpoznanie. Príklad aplikovateľnosti chirálnych stacionárnych fáz (CSF) na báze teikoplanínu 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 aminokyselín pre ich následné stanovenie vo vzorkách výživových doplnkov metódou vysokoúčinnnej 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, trietylamín (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 lekární.

### HPLC podmienky

Kvapalinový chromatograf Agilent Technologies (séria 1100) pozostával z binárneho vysokotlakového čerpad-

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 teikoplanín), IP-CF6 (chirálny selektor izopropylkarbamát cyklofruktánu 6) a Chiradex (chirálny selektor  $\beta$ -cyklodextrín,  $\beta$ -CD) (4  $\times$  250 mm ID, 5  $\mu$ m). Mobilné fázy tvorili zmesi: vodný roztok acetonitrilu (pre T a  $\beta$ -CD), n-hexán/etanol/kyselina trifluorooctová (pre IP-CF6 a  $\beta$ -CD) a metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamín (pre  $\beta$ -CD). Prietok mobilnej fázy bol 0,8 ml.min<sup>-1</sup> a dávkovaný objem 20  $\mu$ l. 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 zodpovedajúcej 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  $\mu$ m membránový filter a následne dávkovaný do HPLC. Extrakt vzorky 2 sa pred HPLC analýzou riedili 5-krát mobilnou fázou.

### Analytické parametre

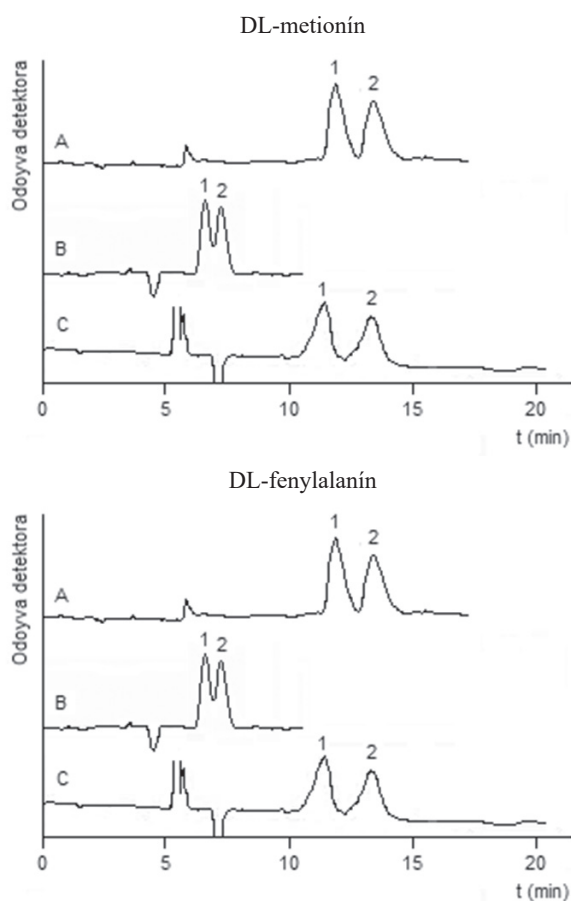
Na hodnotenie vhodnosti HPLC metódy sa použili parametre: linearita, medza detekcie, medza stanovenia, presnosť a výťažnosť.

Matricové kalibračné závislosti boli zostrojené v rozsahu koncentrácií 0,3–500  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> pre enantioméry metionínu a 0,2–500  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> pre enantioméry fenylalanínu (šesť kalibračných roztokov, 7-krát pripravené). Kalibračné roztoky boli dávkované 3-krát. Parametre kalibračných závislostí, závislosti plochy píku ( $y$ ) enantioméru od koncentrácie ( $x$ , v  $\mu$ g.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.

Vnútrodnová a medzidňová presnosť metódy boli hodnotené z opakovaných analýz vzoriek (7-krát pripravené) 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

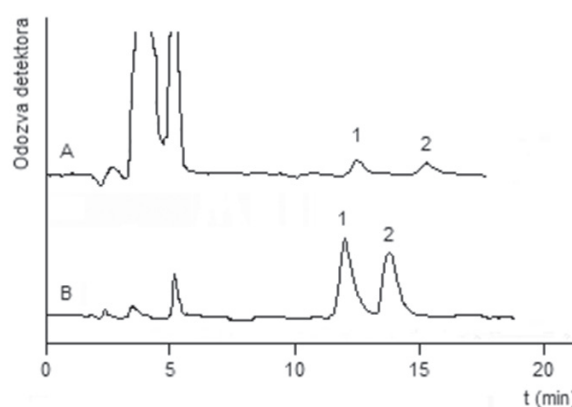
Chromatografické podmienky: (A) Chirobiotic T, mobilná fáza acetonitril/voda (75/25, v/v); (B) IP-CF6, mobilná fáza metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2, v/v/v/v); (C) IP-CF6, mobilná fáza n-hexán/etanol/kyselina trifluóroctová (50/50/0,1, v/v/v); prietok mobilnej fázy: 0,8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

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: Chirobiotic 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 trifluóroctová (25/75/0,2 v/v/v). Účinnosť kolóny však bola nízka a uvedená stacionárna fáza ani v jednom s testovaných separačných usporiadaní 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-, dabzyl-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 trifluóroctová ako mobilná fáza) separačnom systéme fáz. V systéme s polárno-organickým usporiadaním 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 elúcii 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, tlmivý 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 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	D,L-fenylalanín			LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
			$R_{ij}$	$k_1$	$\alpha$		$R_{ij}$	$k_1$	$\alpha$	
T	RP	a	3,0	1,3	1,5	0,1/0,1	1,6	0,9	1,3	0,05/0,06
$\beta$ -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,  $\beta$ -CD –  $\beta$ -cyklodextrín, RP – separačný systém s obráteným usporiadaním fáz, NP – separačný systém s konvenčným usporiadaním fáz, PO – polárno-organický separačný systém,  $R_{ij}$  – rozlíšenie,  $k_1$  – retenčný faktor enantioméru, ktorý eluje z chromatografickej kolóny ako prvý,  $\alpha$  – 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/v), 0 °C; c – metanol/acetonitril/kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2 v/v/v/v), 0 °C; d – etanol/n-hexán/kyselina trifluórooctová (60/40/0,1 v/v/v), 0 °C; RSD( $k$ )  $\leq$  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 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0,3–500 $r^2 = 0,999$	0,3–500 $r^2 = 0,998$	0,2–500 $r^2 = 0,989$	0,2–500 $r^2 = 0,995$
LOD ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0,1	0,1	0,05	0,06
LOQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	0,3	0,3	0,2	0,2
presnosť (RSD %) vnútrodňová	5,5	6,7	5,8	4,3
medzidňová	8,3	7,1	8,2	7,9
výťažnosť (%) C1	97,6	98,2	98,5	98,2
C2	98,1	97,5	96,1	95,8
C3	97,1	94,8	96,8	96,6

LOQ – medza stanovenia, LOQ – medza detekcie, C1 – 20  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-fenylalanín, 5  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-metionín, C2 – 143  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-fenylalanín, 10  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-metionín, C3 – 357  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-fenylalanín, 25  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  pre D- a L-metionín

kyselina octová/trietylamin (75/25/0,3/0,2 v/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 cyklofruktán 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. Závislosti 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 aminokyselín

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 najúčinnějšía enantioseparácia (najvyššie hodnoty rozlíšenia enantiomérov) sa dosiahla na použití 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  $\beta$ -cyklodextrínu (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 nechťov a vlasov. Výsledky ukázali, že testovaný výživový doplnok, tak ako uvádza výrobca, obsahuje zmes enantiomérov metionínu (obr. 2). Ďalšími zložkami výživového doplnku boli L-cysteín, vitamíny a iné stopové prvky, ktoré pri použitých separačných podmienkach neinterferovali so žiadnou 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 výživy s obsahom fenylalanínu (vzorka 2) je doporučené používať na zlepšenie pamäti a pri mentálnej únave. 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 enantiomérnymi formami fenylalanínu.

## Záver

Aminokyseliny patria medzi jednu z najdôležitejších skupín biologicky aktívnych látok. HPLC enantioseparácia nederivatizovaných aminokyselín 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.

## PodĎakovanie

Práca vznikla za podpory grantu APVV-15-0355 Agentúry na podporu výskumu a vývoja. Autori ďakujú prof. D.W. Armstrongovi za poskytnutie chirálnych stacionárnych fáz Chirobiotic T a IP-CF6.

**Stret záujmov:** žiadny.

## Literatúra

1. 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.
2. Zahradníčková H., Haratvich P., Holoubek, I. Historie a význam chirálných analýz aminokyselín v biologických maticích a v životním prostředí. *Chem. Listy.* 2005; 99, 703–710.
3. Brückner H., Westhauser T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. *Amino acids* 2003; 24, 43–55.
4. Shinitzky M., Nudelman F., Barda Y., Haimovitz R., Chen E., Dealer D. W. Unexpected differences between D- and L- tyrosine 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.
5. MacDermott A. J. Electroweak enantioselection and the origin of life. *Orig. Life Evol. Biosphere* 25 (1995) 191–199.
6. Wu G. *Amino Acids: Biochemistry and nutrition.* Boca Raton: CRC Press 2013.
7. Armstrong D. W., Youbang L., Ekborgott K. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparations. *Chirality* 1995; 7, 474–497.
8. Ilisz I., Berkecz R., Forro E., Fülöp 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.
9. 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.
10. Moravčík J., Hroboňová K. Separácia enantiomérov aminokyselín metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. *Čes. slov. Farm.* 2014; 63, 4–12.
11. Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C., Chen J.-R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1994; 66, 1473–1484.
12. 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.
13. Lee S. H., Berthod A., Armstrong D. W. Systematic study on the resolution of derivatized amino acids enantiomers on different cyclodextrin-bonded stationary phases. *J. Chromatogr.* 1992; 603, 83–94.