

STANOVENÍ ENANTIOMERŮ THEANINU POMOCÍ HPLC, POROVNÁNÍ METOD DETEKCE

TEREZA ŠLECHTOVÁ, KVĚTA KALÍKOVÁ
a EVA TESAŘOVÁ

Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 2030, 128 43 Praha 2
tesarove@natur.cuni.cz

Došlo 16.11.12, přijato 30.1.13.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: HPLC, theanin, derivatizace, 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid, dansyl chlorid

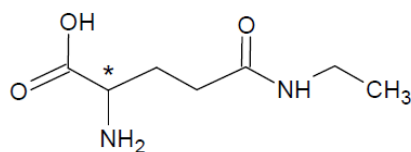
Úvod

V dnešní době je průmyslově vyráběno mnoho chirálních látek, které nacházejí uplatnění například jako pesticidy, léčiva nebo potravinová aditiva. V chirálním prostředí mohou jednotlivé enantiomery vykazovat různé chemické nebo fyzikální vlastnosti jako důsledek rozdílného prostorového uspořádání, a tudíž umožnění odlišných interakcí.

Mezi chirální látky se řadí i aminokyseliny, které mohou, ale také nemusí, být stavebními kameny proteinů v živých organismech. Jednou z neproteingenních aminokyselin je theanin (obr. 1), látka vyskytující se v listech čajovníku, která je zodpovědná za některé zdraví prospěšné účinky čaje. Jako naprostá většina aminokyselin se také theanin vyskytuje ve formě dvou enantiomerů¹. Je běžné, že se v listech čajovníku vyskytuje příměs D-theaninu, ale jeho množství je obvykle velmi malé². Nezvykle vysoké množství D-theaninu v čaji pak může signalizovat nevhodné zacházení, např. nevhodné zpracování a skladování nebo způsob přepravy, nebo může poukazovat na původ čaje^{3,4}.

Dále se s theaninem můžeme setkat v různých potravinových doplňcích, které jsou vyráběny právě kvůli pozitivním účinkům této aminokyseliny na lidské zdraví – snižování krevního tlaku, zmírňování nežádoucích efektů kofeinu, zlepšování paměti nebo odbourávání stresu².

Poprvé byl L-theanin schválen jako doplněk stravy v Japonsku v roce 1964 a v současné době existuje více



Obr. 1. Struktura theaninu

než 50 potravinových doplňků obsahujících L-theanin². Přestože v roce 1990 byla v Japonsku vynalezena metoda produkce vysoce čistého L-theaninu za použití mikroorganismů², problém s enantiomerní čistotou potravinových doplňků na bázi theaninu je i v dnešní době aktuální, jak ukázala studie z roku 2004 (cit.⁵). V této studii bylo analyzováno šest komerčně dostupných výrobků z USA, Kanady a Číny, které měly všechny obsahovat pouze L-theanin, ale pět z nich obsahovalo racemát. Toto zjištění je poměrně důležité, protože stále ještě není známo, jaké má konzumace D-theaninu účinky na lidský organismus a jestli není ve větším množství zdraví nebezpečný. Například bylo zjištěno, že při nahromadění některých D-aminokyselin v lidském těle, způsobeném nízkou enzymatickou aktivitou, může dojít k vyvolání řady poškození, jako je např. potlačení růstu³.

Vzhledem k tomu, že potravinové doplňky na bázi theaninu jsou často vyráběny jako racemáty, byla na krycích provedena studie⁶, jejímž cílem bylo stanovit, jestli D- a L-theanin mají stejné farmakokinetické vlastnosti, jestli je racemát metabolizován stejným způsobem jako jednotlivé enantiomery a jestli přítomnost obou enantiomerů ovlivňuje jejich absorpci v gastrointestinálním traktu a vylučování močí. Výsledkem bylo zjištění, že přítomnost D-enantiomeru snižuje absorpci L-enantiomeru a naopak. Dále se ukázalo, že D-theanin je ihned vylučován močí, zatímco L-theanin je v ledvinách nejprve metabolizován na ethylamin a kyselinu glutamovou, a až poté vyloučen močí. Z těchto poznatků je zřejmé, že enantiomery theaninu nejsou bioekvivalentní, a proto může být působení potravinových doplňků rozdílné v závislosti na jejich enantiomerním složení.

V návaznosti na uvedené studie se tato práce zabývá optimalizací separace enantiomerů theaninu metodou HPLC pro analýzu potravinového doplňku dostupného v České republice. Zvláštní pozornost je věnována možností zvýšení citlivosti detekce pomocí derivatizace. Mezi nejčastěji používaná derivatizační činidla pro stanovení aminokyselin patří *o*-ftalaldehyd (OPA)⁷, dansyl chlorid (Dns-Cl)^{8,9}, 9-fluorenylmethoxykarbonyl chlorid (FMOC-Cl)^{10,11}, 6-aminochinoly-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC)¹² a ninhydrin¹³. Pro účely této práce byly vybrány FMOC-Cl a Dns-Cl, neboť jejich deriváty je možné detegovat spektrofotometrií v UV oblasti i fluorescenčně.

Experimentální část

Použité chemikálie

Pro optimalizaci separace byly použity standardy: L-theanin (Sigma-Aldrich, Praha, ČR), D-theanin a DL-theanin (dar od Dr. D.W. Armstronga, University of Texas, USA). Pro derivatizaci theaninu byl použit FMOC-Cl, čistota $\geq 99\%$ a Dns-Cl, čistota $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Methanol Chromasolv, gradient grade pro HPLC; acetonitril Chromasolv, gradient grade pro HPLC; triethylamin, čistota $\geq 99\%$; byly zakoupeny také od firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR). Dále byly použity: octová kyselina 99 % p.a. (Fluka, Buchs, Švýcarsko); hy-

drogenuhlíčan sodný, p.a., hydroxid sodný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR) a *n*-pentan p.a. (Lachema, Brno, ČR). Analyzován byl potravinový doplněk „L-Theanin – ochrana a uvolnění” s deklarovaným obsahem 200 mg účinné látky v jedné tabletě (Naturix, Vetrisol s.r.o., Praha, ČR). Deionizovaná voda byla připravena systémem Mili-Q (Millipore, Milford, MA, USA).

Příprava vzorků

Standardní roztoky theaninu pro analýzu bez derivatizace byly připraveny rozpuštěním v methanolu resp. v destilované vodě na koncentraci 1 mg ml⁻¹ a dále ředěny dle potřeby.

Standarty theaninu pro derivatizaci Fmoc-Cl byly rozpuštěny v 0,2 M NaHCO₃, pH 9,0 (pH upraveno přidáním 0,5 M NaOH) na koncentraci 0,2 mg ml⁻¹. Roztok Fmoc-Cl byl připraven rozpuštěním v acetonitrilu (ACN) na výslednou koncentraci 2 mg ml⁻¹. Derivatizační směs vznikla smícháním zásobních roztoků v poměru 1:1. Následně byla směs řádně promíchána a 20 min ponechána v klidu při laboratorní teplotě.

Pro derivatizaci Dns-Cl byly standarty rozpuštěny v destilované vodě na koncentraci 1 mg ml⁻¹ a roztok derivatizačního činidla byl připraven rozpuštěním 0,02 g Dns-Cl v 1 ml ACN. Derivatizační směs obsahovala 100 ml roztoku theaninu, 60 ml 0,2 M NaHCO₃, pH 9,5 (pH upraveno přidáním 0,5 M NaOH) a 60 ml Dns-Cl. Směs byla důkladně promíchána. Pro porovnání účinnosti dansylace bylo zvoleno několik způsobů přípravy derivátů: reakce při laboratorní teplotě přes noc (14 hodin), reakce v temnu a za světla při teplotě 80 °C po dobu 30, 45 a 50 min. Reakce byla zastavena přidáním 40 ml octové kyseliny a vychlazená směs byla centrifugována po dobu 5 min.

Vzorky pro analýzu tablety „L-Theanin – ochrana a uvolnění” byly připraveny následujícím způsobem: tableta byla rozdrcena v třecí misce na jemný prášek, 1 mg prášku byl rozpuštěn v 1 ml destilované vody a roztok byl přefiltrován přes 0,45 μm nylonový filtr. Derivatizace byla prováděna stejným způsobem jako v případě standardů.

Přístroje a pomůcky

Pro chromatografickou analýzu se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti byl použit kapalinový chromatograf Breeze System, skládající se z gradientové pumpy 1525, vakuového odplyňovače, automatického dávkovače vzorků 717 Plus, termostatu Jetstream 2 Plus, UV/VIS dvoukanalového detektoru 2487 a počítačového programu Breeze verze 3.30 SPA (Waters, MA, USA). Pro stanovení limitů detekce a stanovitelnosti při fluorescenční detekci byl použit kapalinový chromatograf, jehož součástí byly: vysokotlaká gradientová pumpa model Crystal 200, fluorescenční detektor FL 2000 (Spektra System, USA), membránový vakuový odplyňovač CSI6150 (Cambridge Scientific Instruments, UK), dávkovací ventil Rheodyne (Cotati, CA, USA) se smyčkou o objemu 5 μl. Ke zpracování dat sloužil program Clarity verze 2.8 (Data Apex, Praha, ČR).

Pro separaci byla použita kolona Chirobiotic T s chirální stacionární fází na bázi teikoplaninu vázaného na silikagelovém nosiči, rozměry 250 mm x 4,6 mm, zrnění 5 μm (Supelco, USA). Dále byl použit pH-metr PHM 220 s kombinovanou skleněnou elektrodou (Radiometer, Kodaň, Dánsko), centrifuga Centrifuge 5418 Eppendorf (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany u Prahy, ČR) a filtry 0,45 μm Sartorius Minisart (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Německo).

Mobilní fáze a podmínky měření

Pro chirální separaci nederivatizovaných aminokyselin byla jako optimalizovaná mobilní fáze použita směs methanol/voda v poměru 60/40 (v/v). Detekce byla provedena při vlnové délce 205 nm (cit.¹⁰). Pro separaci derivatizovaných aminokyselin byly použity mobilní fáze skládající se z methanolu a 1,0% nebo 0,5% triethylaminoctanového pufru (TEAA) o pH 4,0, 5,0 nebo 6,0 v různých objemových poměrech. Pufry byly připraveny z destilované vody a triethylaminu, na požadovanou hodnotu pH byl upraven přidáním octové kyseliny.

Detekce derivátů Fmoc-Cl v UV oblasti probíhala při vlnové délce 262 nm (cit.¹⁰) a fluorescenční detekce byla prováděna při excitační vlnové délce 254 nm a emisní vlnové délce 314 nm (cit.¹¹). Detekce aminokyselin derivatizovaných dansyl chloridem probíhala v UV oblasti při 254 nm (cit.⁸) a fluorescenční detekce při vlnových délkách 340 nm pro excitaci a 516 nm pro emisi záření⁹.

Všechna měření na kapalinovém chromatografu Breeze probíhala při teplotě 25 °C. Analýzy s fluorescenční detekcí probíhaly za laboratorní teploty 22 ± 2 °C. Průtok mobilní fáze byl 1 ml min⁻¹.

Určení limitů detekce a stanovitelnosti

Kalibrační roztoky byly získány ředěním zásobních roztoků nederivatizovaného a derivatizovaného DL-theaninu. Proměřeny byly koncentrace v rozmezí 0,5–0,0025 mg ml⁻¹. Na každé koncentrační hladině bylo měření provedeno třikrát. Závislosti odezvy na koncentraci byly zpracovány lineární regresí (hodnoty korelačních koeficientů byly vždy vyšší než 0,997).

Výsledky a diskuse

Optimalizace separace nederivatizovaného a derivatizovaného theaninu

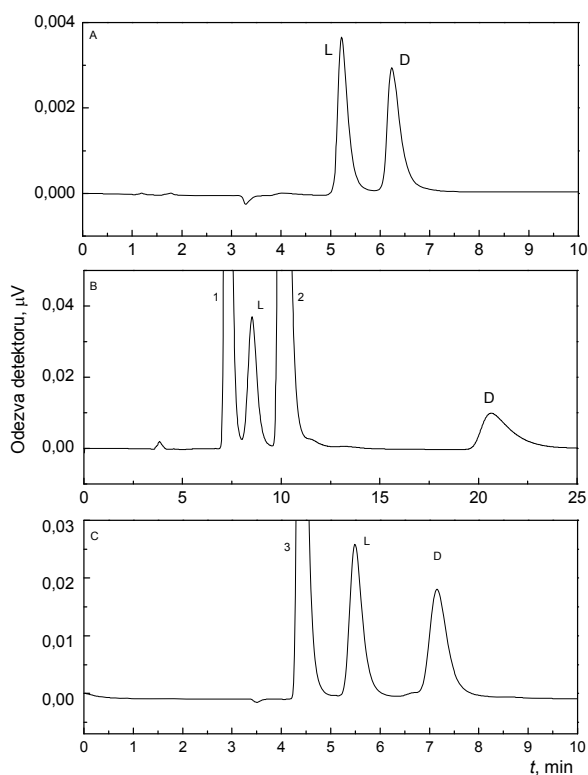
Pro separaci nederivatizovaných enantiomerů theaninu na chirální stacionární fází na bázi teikoplaninu bylo možné použít jednoduchou mobilní fázi tvořenou pouze methanolem (MeOH) a vodou. Optimalizovaná mobilní fáze se skládala z MeOH a vody v objemovém poměru 60/40.

Standarty byly nejprve rozpouštěny v methanolu, který však poskytoval velice výrazné systémové píky. Proto byl následně theanin rozpuštěn v destilované vodě.

Tím došlo i ke zvýšení symetrie píků theaninu. Ilustrativní chromatogram enantioseparace nederivatizovaného theaninu za optimalizovaných podmínek je na obr. 2A.

Pro separaci FMOC-Cl derivátů theaninu byla použita mobilní fáze složená z methanolu a TEAA pufru. V průběhu optimalizace byly vyzkoušeny 0,5% a 1,0% TEAA pufru o pH 4,0, 5,0 a 6,0 a různé poměry MeOH/pufr (v/v). Při použití 0,5% TEAA pufrů docházelo při vyšším množství methanolu v mobilní fázi ke koeluci L-theaninu s píky derivatizačního činidla. Snížení množství methanolu vedlo k výraznému prodloužení retence. Z těchto důvodů byla jako nejvhodnější vybrána mobilní fáze skládající se z methanolu a 1,0% TEAA pufru o pH 6,0 v objemovém poměru 30/70, kdy pík L-enantiomeru eluoval mezi píky derivatizačního činidla (obr. 2B).

Při některých stanoveních aminokyselin popsanych v literatuře byla pro odstranění přebytku derivatizačního činidla a jeho hydrolytického produktu, které mohou komplikovat následné dělení derivátů enantiomerů, použita extrakce organickým rozpouštědlem, např. pentanem¹⁴. Podle některých autorů¹⁵ by však tento krok mohl vést ke



Obr. 2. Chromatogramy enantioseparace (A) DL-theaninu, (B) FMOC-DL-theaninu, (C) Dns-DL-theaninu. Stacionární fáze Chirobiotic T, (A) mobilní fáze MeOH/voda 60/40 (v/v), 205 nm, průtok 1 ml min^{-1} , 25°C ; (B) mobilní fáze MeOH/1,0% TEAA pufr, pH 6,0 30/70 (v/v), průtok 1 ml min^{-1} , 262 nm, 25°C ; (C) mobilní fáze MeOH/1,0% TEAA, pH 6,0 40/60 (v/v), průtok 1 ml min^{-1} , 254 nm, 25°C . L – L-enantiomer; D – D-enantiomer; 1, 2, 3 – přebytek derivatizačního činidla

ztrátě určitého množství derivatizované aminokyseliny (prokázáno u histidinu, ornithinu a lysinu). V této práci nebyly zaznamenány žádné ztráty derivátů theaninu při extrakci pentanem.

Různé způsoby přípravy dansyl derivátů byly vyzkoušeny s cílem najít nejvhodnější postup. Řada derivatizačních reakcí popsanych v literatuře^{16–18} probíhala ve tmě vzhledem k citlivosti dansyl derivátů na světlo. Proto byla v této práci porovnána výtěžnost dansylace probíhající jak v temnu, tak na světle při teplotě 80°C . Testovaná doba reakce byla 30, 45 a 50 min. Byla však zkoušena i reakce trvající 14 hodin, probíhající za laboratorní teploty.

Získané výsledky ukázaly, že přístup světla neměl na reakci negativní vliv. Výtěžek reakce se však zvyšoval s rostoucí dobou reakce. Nejvyšší výtěžek byl získán při derivatizaci prováděné za laboratorní teploty po dobu 14 hodin. Tento způsob derivatizace byl vybrán pro další práci.

Mobilní fáze skládající se z methanolu a 0,5% nebo 1,0% TEAA pufru, pH 6,0, v různých poměrech byly testovány v rámci optimalizace separačních podmínek pro dělení dansyl derivátů theaninu. Bylo porovnáváno rozlišení a separační účinnost a jako optimální byla zvolena mobilní fáze o složení MeOH/1,0% TEAA pufr, pH 6,0, 40/60 (v/v). V této mobilní fázi docházelo k dobrému oddělení obou enantiomerů theaninu, které eluovaly za píkem derivatizačního činidla a vykazovaly symetrické píky (obr. 2C).

Porovnání optimalizovaných metod stanovení

Za použití derivatizace byly podle očekávání získány výrazně nižší limity detekce a stanovitelnosti, jak znázorňuje tabulka I. Detekční limity naměřené spektrofotometrií v UV oblasti pro L-theanin byly poněkud nižší při derivatizaci pomocí FMOC-Cl, ale v případě D-theaninu tomu bylo naopak. Tento rozdíl byl způsoben podstatně delším retenčním časem FMOC-D-theaninu, jehož pík se rozmýval. Při použití jiné mobilní fáze s vyšší eluční silou by s největší pravděpodobností byl limit detekce FMOC-D-theaninu nižší než u dansyl derivátu. Mohlo by však dojít ke koeluci L-enantiomeru s derivatizačním činidlem. Dále bylo zjištěno, že se detekční limity získané při fluorescenční detekci podstatně snížily u derivátů FMOC-Cl až na desítky ng ml^{-1} pro L-theanin resp. jednotky ng ml^{-1} pro D-theanin, zatímco u derivátů dansyl chloridu se zhoršily na desítky $\mu\text{g ml}^{-1}$. Z těchto výsledků je patrné, že pro stanovení theaninu je nejvhodnější použít jako derivatizační činidlo FMOC-Cl a fluorescenční detekci.

Derivatizační metody optimalizované v této práci jsou podle zjištěných limitů detekce a stanovitelnosti pro deriváty theaninu citlivější než metody použité v dříve publikované studii⁴, kde byla použita stejná derivatizační činidla.

Analýza potravinového doplňku obsahujícího L-theanin

S enantiomerním zastoupením úzce souvisí kvalita potravin resp. možnosti jejího falšování¹⁹. V případě potravinových doplňků se, analogicky jako u léčiv, sleduje

Tabulka I

Porovnání limitů detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) derivatizovaných a nederivatizovaných enantiomerů theaninu za optimalizovaných podmínek

Derivatizační činidlo	L-theanin		D-theanin	
	LOD [ng ml ⁻¹]	LOQ [ng ml ⁻¹]	LOD [ng ml ⁻¹]	LOQ [ng ml ⁻¹]
<i>UV detekce</i>				
---	255	849	568	1890
FMOC-Cl	9,50	31,7	37,7	126
Dns-Cl	17,7	59,1	25,9	86,5
<i>Fluorescenční detekce</i>				
FMOC-Cl	0,755	2,52	4,26	14,2
Dns-Cl	584	1950	832	2770

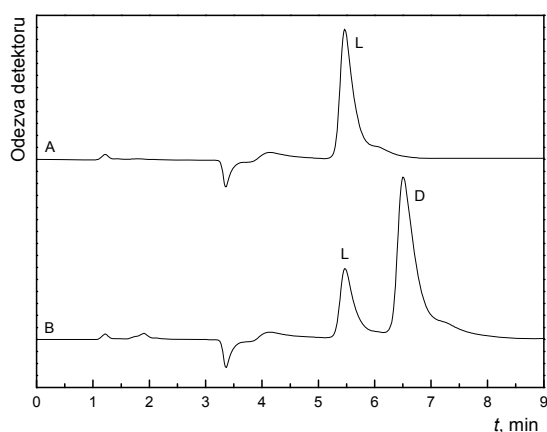
enantiomerní čistota, obzvláště v případech, kdy není ujasněno, jaký vliv může mít odlišný enantiomer na lidský organismus. Již dříve bylo publikováno, že některé potravinové doplňky na bázi L-theaninu obsahovaly racemát obou enantiomerů, i když by měly obsahovat pouze L-enantiomer⁵. Proto byla, za optimalizovaných podmínek zjištěných v této práci pro separaci nederivatizovaných aminokyselin, provedena analýza tablety „L-Theanin – ochrana a uvolnění“. Cílem bylo zjistit, zda se v potravinovém doplňku nevyskytuje příměs D-enantiomeru. Výsledky neprokázaly přítomnost D-theaninu v této tabletě (obr. 3). Je však možné, že tato metoda nebyla dostatečně citlivá, aby odhalila velmi nízkou koncentraci D-enantiomeru. Proto byla následně na stejné koloně za optimalizovaných separačních podmínek provedena analýza theaninu po derivatizaci FMOC-Cl (obr. 4), a také po

derivatizaci dansyl chloridem (obr. 5) za použití UV detekce. Ani těmito postupy nebyla zjištěna příměs D-enantiomeru.

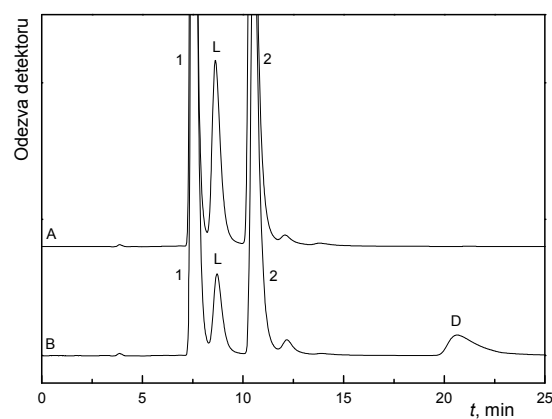
Z uvedených výsledků je patrné, že v daném potravinovém doplňku se D-theanin nevyskytuje nebo je zde přítomen v množství menším než jsou hodnoty LOD.

Závěr

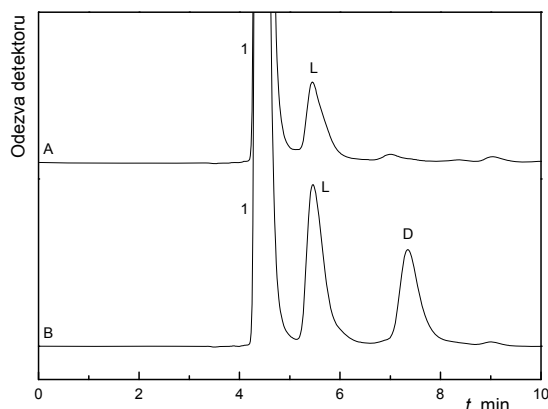
Byly optimalizovány metody separace enantiomerů theaninu bez a s použitím derivatizace 9-fluorenyl-methoxykarbonyl chloridem a dansyl chloridem. Po optimalizaci separačních systémů a postupů derivatizace byly u každé metody zjištěny limity detekce a stanovitelnosti a byl analyzován vybraný potravinový doplněk s ohledem



Obr. 3. Analýza nederivatizovaného potravinového doplňku obsahujícího theanin. Stacionární fáze: Chirobiotic T, mobilní fáze: MeOH/voda 60/40 (v/v), 205 nm, průtok: 1 ml min⁻¹, 25 °C. A – tableta, B – tableta + D-theanin, L – L-enantiomer, D – D-enantiomer



Obr. 4. Analýza potravinového doplňku obsahujícího theanin po derivatizaci FMOC-Cl. Stacionární fáze: Chirobiotic T, mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA, pH 6,0 30/70 (v/v), průtok: 1 ml min⁻¹, 262 nm, 25 °C. A – FMOC-tableta, B – FMOC-tableta + FMOC-D-theanin; L – L-enantiomer, D – D-enantiomer, 1, 2 – přebytek derivatizačního činidla



Obr. 5. Analýza potravinového doplňku obsahujícího theanin po derivatizaci dansyl chloridem. Stacionární fáze: Chirobiotic T, mobilní fáze: MeOH/1,0% TEAA pufr, pH 6,0 40/60 (v/v), průtok: 1 ml min⁻¹, 254 nm, 25 °C. A – Dns-tableta, B – Dns-tableta + Dns-DL-theanin; L – L-enantiomer, D – D-enantiomer, 1 – přebytek derivatizačního činidla

na přítomnost enantiomerů theaninu.

Podle očekávání byly použitím derivatizace získány výrazně nižší limity detekce a stanovitelnosti při detekci v UV oblasti spektra. Lze říci, že citlivost detekce enantiomerů theaninu se po derivatizaci řádově zvýšila ve srovnání s nederivatizovanými analyty. V souladu s literaturou se detekční limity při fluorescenční detekci podstatně snížily pro deriváty FMOC-Cl, až na desetiny ng ml⁻¹ pro L-theanin (resp. jednotky ng ml⁻¹ pro D-theanin), zatímco u derivátů dansyl chloridu se zhoršily na desetiny µg ml⁻¹.

Ani jednou z optimalizovaných metod nebyla v potravinovém doplňku zjištěna přítomnost D-theaninu. Výsledné zjištění je důležité, neboť metabolické dráhy D-theaninu ještě nebyly detailně prozkoumány a není jisté, jestli by jeho konzumace ve větším množství neměla za následek zdravotní komplikace.

Tato práce vznikla za finanční podpory GA AV, grant IAAX00100903 a dlouhodobého záměru MSM002162085.

LITERATURA

1. Ekborg-Ott K. H., Taylor A., Armstrong D. W.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 353 (1997).
2. Gilbert M.: *Natural Foods Merchandiser* 25, 46 (2008), <http://newhope360.com/beverage/tea-leaves-promise-well-being>, staženo 13.7.2011.
3. Srkalová S., Kalíková K., Tesařová E.: *Chem. Listy* 102, 480 (2008).

4. Zahradníčková H., Hartvich P., Holoubek I.: *Chem. Listy* 99, 703 (2005).
5. Desai M. J., Armstrong D. W.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18, 251 (2004).
6. Desai M. J., Gill M. S., Hsu W. H., Armstrong D. W.: *Chirality* 17, 154 (2005).
7. Sari F., Velioglu Y. S.: *J. Food Compos. Anal.* 24, 1130 (2011).
8. Pittler E., Schmid M. G.: *Biomed. Chromatogr.* 24, 1213 (2010).
9. Minocha R., Long S.: *J. Chromatogr., A* 1035, 63 (2004).
10. Subramanian G.: *Chiral Separation Techniques: a Practical Approach*, str. 1–2, Wiley-VCH, Berlin 2007.
11. Repko P.: *Diplomová práce*. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2011.
12. Bosch L., Alegria A., Farré R.: *J. Chromatogr., B* 831, 176 (2006).
13. Suna S., Lina Y., Wenga Y., Chen M.: *J. Food Compos. Anal.* 19, 112 (2006).
14. Bank R. A., Jansen E. J., Beekman B., Koppele J. M.: *Anal. Biochem.* 240, 167 (1996).
15. Jámboř A., Molnár-Perl I.: *J. Chromatogr., A* 1216, 3064 (2009).
16. Lee W. Y., Nieman T. A.: *J. Chromatogr., A* 659, 111 (1994).
17. Kang X., Xiao J., Huang X., Gu Z.: *Clin. Chim. Acta* 366, 352 (2006).
18. Jonesa D. P., Carlsona J. L., Samieca P. S., Sternberg P., Mody V. C., Reed R. L., Brown L. A. S.: *Clin. Chim. Acta* 275, 175 (1998).
19. Čížková H., Ševčík R., Rajchl A., Pivoňka J., Volčich M.: *Chem. Listy* 106, 903 (2012).

T. Šlechtová, K. Kalíková, and E. Tesařová
(*Department of Physical and Macromolecular Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **Determination of Theanine Enantiomers by HPLC; Comparison of Detection Methods**

Theanine, a non-proteinogenic amino acid present in tea leaves, is well known for its health promoting effects such as lowering blood pressure, reducing caffeine side effects, improving memory and supporting the immunity system. Theanine occurs in dietary supplements as racemate, while they should contain only the L-enantiomer. The article deals with the optimization of separation and detection of underivatized and derivatized theanine enantiomers on a chiral teicoplanin-based stationary phase. The chromatographic limits of detection and quantification were determined with the aim to assess the content of the theanine enantiomers in dietary supplements.