

STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN V BIOLOGICKÝCH TEKUTINÁCH KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZOU

PETR TŮMA A EVA SAMCOVÁ

Centrum biomedicínských oborů, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00 Praha 10
petr.tuma@lf3.cuni.cz

Došlo 15.12.05, přepracováno 9.5.06, přijato 19.6.06.

Klíčová slova: proteinogenní aminokyseliny, kapilární elektroforéza, bezkontaktní vodivostní detekce, biologický materiál

Obsah

1. Úvod
2. Elektroforetická separace aminokyselin
3. Fotometrická detekce v UV oblasti a detekce fluorescenční
4. Elektrochemická detekce
5. Nepřímá fotometrická detekce
6. Bezkontaktní vodivostní detekce
7. Praktické stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí
8. Závěr

1. Úvod

Aminokyseliny (AMK) mají pro živé organismy zásadní význam. AMK jsou základními stavebními kameny proteinů – biologických makromolekul, které na jedné straně katalyzují biochemické reakce (enzymy) a na druhé straně vytvářejí pevné struktury buněk, tkání a celých organismů. AMK jsou základní strukturou peptidů, které často plní funkci především informačních molekul (hormony). Z AMK je syntetizována řada biologicky aktivních molekul jako jsou např. neurotransmitery, mezi které patří adrenalin, noradrenalin, serotonin, dopamin a další^{1,2}. AMK vstupují v organismu do intermediárního metabolismu a jejich oxidace přispívá za normálních podmínek asi v 10–20 % k oxidačnímu metabolismu organismu. Za nefyziologických podmínek se stávají významným zdrojem energie organismu (např. hladovění).

Proteiny jsou v živých organismech složkou všech tkání. Význam jejich metabolismu se však v jednotlivých tkáních mění. Ve tkáních jsou proteiny štěpeny na AMK a z aminokyselin se opět vytvářejí nové proteiny. Průběžně se doplňuje zásoba (pool) aminokyselin v těle hydrolyzou bílkovin z potravy nebo jejich syntézou. Protože místa uvolňování a spotřeby AMK jsou většinou prostorově

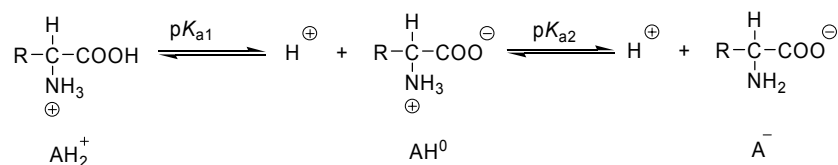
oddělena, musí docházet k přenosu aminokyselin mezi jednotlivými tkáněmi. AMK jsou v organismu transportovány ve volné formě rozpuštěné v krevní plazmě. Nalezneme je ovšem jako volné i v ostatních tělních tekutinách, jako je tkáňový mok, moč, plodová voda a mozkomíšní mok. Stanovení jejich koncentrací v těchto biologických tekutinách je důležitým klinickým ukazatelem. Poukazuje nejen na aktuální výživový stav organismu, ale zvýšené popř. snížené hladiny některých AMK jsou přímým ukazatelem některých vrozených metabolických vad, jako je argininémie, citrulinémie, homocystinurie, choroba javorového sirupu (maple syrup urine disease), hypermethioninémie, tyrosinémie či argininsukcinaturie^{3–5}.

2. Elektroforetická separace aminokyselin

V biochemických laboratořích jsou standardně pro stanovení AMK používány automatické jednoúčelové analyzátory pracující na principu iontovýměnné chromatografie nebo chromatografie na chemicky vázaných fázích s postkolonovou derivatizací ninhydrinem^{6,7}. Vývoj nových velmi rychlých a spolehlivých analytických metod založených na moderní instrumentaci je pro současnou klinickou praxi nezbytný. Velký potenciál pro stanovení AMK ve velmi složitých matricích, jako jsou biologické tekutiny, nabízí moderní přístroje pro vysokoúčinnou kapilární elektroforézu (CE). Předností CE je především vysoká separační účinnost, malý objem vzorku potřebný k analýze, nízká spotřeba mobilní fáze a vysoká rychlost analýzy^{8–11}. Vysoká rychlost analýzy ve spojení s automatizací umožňuje provádět analýzy velkých souborů vzorků a tím splnit požadavky, které klade současný klinický výzkum.

Proteinogenní AMK jsou nízkomolekulární látky vhodné pro elektroforetickou separaci ve volném roztoku elektrolytu bez použití nosného média. AMK obsahují ve své chemické struktuře slabé disociovatelné skupiny: karboxylovou skupinu, aminoskupinu a některé ještě disociovatelnou skupinu v postranním řetězci. Celkový elektrický náboj AMK závisí na pH použitého separačního elektrolytu. Při postupném zvyšování pH separačního pufru od silně kyselého až po silně zásaditou oblast bude AMK postupně uvolňovat dva protony a přecházet od kationtu AH_2^+ , přes neutrální zwitterion AH^0 až po anion A^- (obr. 1, cit.¹²). U AMK s disociovatelnou skupinou v postranním řetězci je nutné uvažovat i disociaci této skupiny. pK_A karboxylové skupiny proteinogenních AMK se nachází v rozmezí 1,7–2,4 a pK_A aminoskupiny v rozmezí 8,7–10,5 (cit.¹³). AMK lze elektroforeticky stanovovat v jejich kationtové formě v kyselém prostředí kolem pH 2 nebo jako anionty kolem pH 9.

Z pohledu vlastní elektroforetické separace není pro-



Obr. 1. Schéma postupné deprotonizace AMK při zvyšování pH separačního elektrolytu od kyselé po zásaditou oblast

blematické stanovení celého profilu proteinogenních AMK v jejich nativní volné formě, ve které se vyskytují v biologických tekutinách živých organismů. V současné praxi je ovšem pouze okrajovou záležitostí. Komplikovaná je detekce separovaných AMK. Pouze AMK s aromatickou strukturou v postranním řetězci absorbují v UV oblasti spektra, volné nativní AMK neobsahují fluorofory a elektrochemicky aktivních AMK je pouze několik. Tento problém CE analýzy aminokyselin se obchází převedením neaktivních AMK na jejich aktivní deriváty, které poskytují odezvu při použití příslušné detekční techniky. Detekovat všech 20 proteinogenních AMK v jejich volné formě je možné pouze při použití nepřímé UV detekce, detekce vodivosti, popř. méně dostupných a velmi nákladných detekčních technik, jako je hmotnostní a NMR detekce^{8–11,14–16}. Poslední dvě zmiňované detekční techniky nebudou pro svůj malý význam při CE stanovení AMK v tomto článku dále rozebírány.

3. Fotometrická detekce v UV oblasti a detekce fluorescenční

Fotometrická detekce v UV oblasti spektra (UV) obecně nedosahuje v CE takové citlivosti jako v LC, což se v konečném výsledku projeví ve vyšších hodnotách limitu detekce (LOD) v CE. K absorpci záření v CE dochází na velice krátké optické dráze, která je rovna vnitřnímu průměru elektroforetických kapilár (20–100 μm). Navíc z proteinogenních AMK absorbují v UV oblasti elektromagnetického spektra pouze Phe, Trp, Tyr a His a ani tyto AMK nenesou silné chromofory. Mnohem citlivější detekční technikou pro CE je detekce fluorescenční (FD), zejména její varianta, laserem indukovaná fluorescence (LIF). Ale také fluorescenční detekce naráží na nepřítomnost fluoroforů ve struktuře nativních AMK^{8–11,14–16}. Obě tyto detekční techniky jsou z dlouhodobého hlediska nejvýznamnějšími pro detekci AMK a jejich strategie je založena v zabudování silných chromoforů popřípadě fluoroforů do struktury AMK. Derivatizaci je možné provést před vlastní CE separací (pre-column), v průběhu separace (on-column) nebo až po separaci (post-column). Z těchto tří možných variant významně převažuje předkolonová derivatizace. Mezi nejvýznamnější derivatizační činidla patří: 3-(4-karboxybenzoyl)chinolin-2-karbaldehyd (CBQCA), 5-(dimethylamino)naftalen-1-sulfonylchlorid známý pod

názvem dansylchlorid (DnsCl), fluoreskamin, fluorenyl-9-methyl-chloroformiát (FMOC), naftalen-2,3-dikarbaldehyd (NDA), ftaldialdehyd (OPA) a fluoresceinisothio- kyanát (FITC). Tato derivatizační činidla reagují přednostně s primární aminoskupinou AMK. V tabulce I jsou uvedeny příklady využití nejběžnějších derivatizačních činidel při CE stanovení AMK v biologických materiálech. K separaci derivatizovaných AMK se využívá nejen kapilární zónové elektroforézy (CZE) ve volném roztoku elektrolytu, ale také micelární elektrokinetické chromatografie (MECK, cit.¹⁷). V MECK se do vodného separačního pufru přidává detergent, který zde vytváří hydrofobní micely a k separaci dochází na základě rozdílné hydrofobnosti analytů.

Derivatizace je v současné praxi nejrozšířenější strategií CE analýzy AMK a lze při ní dosáhnout velmi nízkých LOD, v oblasti nanomolárních koncentrací. Je nutné si ovšem uvědomit, že derivatizační proces s sebou přináší i komplikace. Především prodlužuje vlastní analýzu o dobu nutnou pro průběh derivatizačních reakcí, tyto reakce nejsou pro všechny AMK stejně rychlé, výsledné produkty jsou obvykle málo stabilní a cena derivatizačních činidel je poměrně vysoká. Navíc některé AMK obsahují primární aminoskupinu také v postranním řetězci a potom při derivatizaci vzniká z jedné AMK více produktů.

4. Elektrochemická detekce

Elektrochemická detekce (ECD) založená na oxidaci nebo redukci analytu na elektrodě se vyznačuje vysokou selektivitou a citlivostí. Z proteinogenních AMK jsou na běžných tuhých elektrodách (Pt, Au, uhlík) elektrochemicky aktivní pouze Tyr a Trp, v omezené míře též Cys a Met (cit.^{38–40}). Využití elektrochemické detekce je opět jako v případě UV a fluorescenční detekce řešeno převedením AMK na jejich elektrochemicky aktivní deriváty. Byly popsány CE/ECD stanovení AMK derivatizovaných OPA (cit.⁴¹) a NDA (cit.^{42–46}), které byly využity při analýzách biologických materiálů – piva⁴⁴, erytrocytů⁴⁵, makrofágů⁴⁶, neuronů⁴³. LOD CE/ECD se pohybuje v rozmezí 10^{-7} – 10^{-6} M. Další možností využití ECD je stanovení obecně neelektroaktivních AMK v jejich volné formě na měděné, popř. niklové elektrodě. Existují patrně dva rozdílné mechanismy v elektrochemickém chování AMK na těchto elektrodách; v neutrálním a slabě alkalickém prostředí jde

Tabulka I

Vybrané aplikace použití derivatizačních činidel v kapilární elektroforéze při stanovení AMK v biologických materiálech

Činidlo	CE mód	Podrobnosti	LOD	Lit.
CBQCA	CZE-LIF	plasma	40 nM	4
CBQCA	CZE-LIF	mikrodialyzát šedé hmoty mozkové	nM	18
DnsCl	MEKC-UV	rostlinný materiál	–	19
Fluoreskamin	CZE-LIF	cytochrom hydrolyzovaný trávicími enzymy	10 nM	20
Fluoreskamin	CZE-UV	taurin v plasmě	nM	21
Fluoreskamin	CZE-LIF	Arg, citrulin v neuronech	5 nM–17 μ M	22
Fluoreskamin	CZE-LIF	AMK a peptidy v neuronech	nM	23
FMOC	MEKC-UV	chirální separace AMK s cykloextriny	–	24
FMOC	CZE-UV	chirální separace AMK s vankomycinem	–	25
FMOC	CZE-LIF	hydroxyprolin a prolin v kolagenu	nM	26
NDA	MEKC-LIF	Asp enantiomery, vzorky potkaního mozku	2 nmol g ⁻¹	27
NDA	MEKC-LIF	Trp enantiomery, biologické vzorky	33 nM	28
NDA	CZE-LIF	Glu, Asp – monitorování potkanů <i>in vivo</i>	–	29
OPA	MECK-LIF	Asp, Glu v tělesných tekutinách	100 nM	30
OPA + FITC	MECK-UV	hydroxyprolin v kolagenu kosterního svalstva	–	31
OPA	CZE-FD	hydrolyzát sojových bobů	2,5–10 μ M	32
OPA	CZE-LIF	obsah AMK v jedné buňce	4 nM–13 μ M	33
FITC	CZE-LIF	deriváty Arg v lidském séru	0,05 μ M	34
FITC	CZE-LIF	AMK v mikrodialyzátu bazálního ganglia	–	35
FITC	CZE-LIF	AMK v mikrodialyzátu thalamu	–	36
FITC	CZE-LIF	Glu, Gln v mozkomíšním moku	–	37

o tvorbu komplexů AMK s Cu²⁺ a Cu⁺ ionty na povrchu elektrody, zatímco v silně alkalickém prostředí jde elektrokatalytický děj^{47–50}.

Elektrochemické detektory ovšem nenalezly v CE takové uplatnění jako v LC. Z tohoto důvodu také nejsou elektrochemické detektory pro CE komerčně dostupné a jednotlivé laboratoře si je vyrábějí samy. Tento fakt má přímou souvislost s rušivým vlivem silného separačního pole na vlastní signál elektrochemického detektoru⁵¹.

5. Nepřímá fotometrická detekce

Elegantní metodou pro detekci látek, které neobsahují ve své struktuře vhodné chromofory, je nepřímá fotometrická detekce s využitím běžně dostupného UV detektoru. Princip nepřímé UV detekce spočívá v přidávku silně absorbující látky do separačního pufu. Silně absorbující ion separačního pufu by měl být zvolen tak, aby měl stejné znaménko náboje jako sledovaný analyt; byl tedy jeho koiontem. Vlivem CE separace je v zóně migrujícího analytu nižší koncentrace absorbujícího koiontu než v okolním separačním elektrolytu. Průchod této zóny foto-

metrickým detektorem se projeví snížením odezvy detektoru a zóna je na elektroferogramu patrna jako záporný pík, tzv. dip^{52,53}. Některé příklady testovaných absorbujících koiontů při praktických analýzách směsí proteinogenních AMK jsou shrnuty v tabulce II.

Nespornou výhodou nepřímé fotometrické detekce je možnost stanovení volných nativních forem AMK fotometrickým detektorem, který je standardní součástí elektroforetických přístrojů. Použití nepřímé UV detekce je ovšem spojeno s volbou málo koncentrovaných separačních elektrolytů, což do značné míry limituje aplikaci této techniky na stanovení látek v biologických tekutinách, které jsou charakteristické vysokým obsahem anorganických solí.

6. Bezkontaktní vodivostní detekce

Zóny analytů v CE mají obecně rozdílnou elektrickou vodivost ve srovnání s vodivostí okolního separačního elektrolytu a pro jejich detekci lze využít univerzální detekční techniku – detekci vodivostní^{60,61}. Vodivostní detekce je založena na měření elektrické vodivosti roztoku v detekční cele mezi dvěma kovovými elektrodami, které

Tabulka II

Vybrané aplikace použití nepřímé UV detekce pro stanovení AMK v biologických vzorcích

Absorbující koion	Podrobnosti	Lit.
4-Aminobenzoová kyselina	modelová směs AMK	54
4-(Dimethylamino)benzoová kyselina	modelová směs	54
4-Aminobenzoová kyselina	plasma, supernatant makrofágové kultury, LOD 2–20 μM	55
Salicylová kyselina	modelová směs	53
Chininsulfát	nádorové buňky	56
Kalixareny	modelová směs	57
Benzoová kyselina	rostlinný materiál, LOD 10–50 mM	58
Adenosinmonofosfát	AMK + fosforylované AMK, LOD 3–6 μM	59

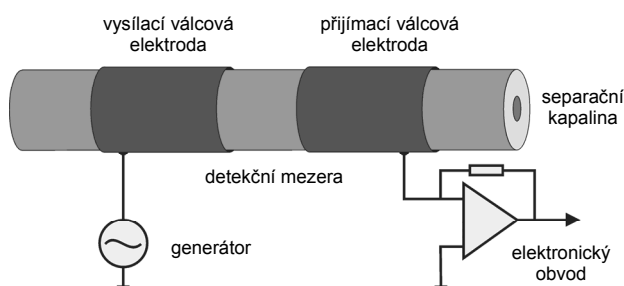
jsou umístěny na výstupu separační kapiláry. V tomto klasickém uspořádání, kdy jsou měřicí elektrody v přímém kontaktu s měřeným roztokem, nedosáhla vodivostní detekce v CE významného uplatnění stejně jako ostatní módy elektrochemické detekce založené na oxidaci nebo redukci analytu. V posledních letech se stala velmi populární vodivostní detekce prováděná v bezkontaktním uspořádání^{62–66}. Nová konstrukce bezkontaktních vodivostních detektorů (CCD) pro CE byla popsána koncem 90. let minulého století^{67,68}. Jde o CCD tvořené dvěma tubulárními, popř. semitubulárními⁶⁹ elektrodami, které jsou umístěny za sebou kolem vnějšího povrchu separační kapiláry a jsou od sebe odděleny detekční mezerou (obr. 2). Na jednu elektrodu je vkládán střídavý signál z generátoru, signál prochází přes stěnu separační kapiláry, je ovlivněn vodivostí zóny v detekční mezeře a poté snímán druhou vodivostní elektrodou. Umístění vodivostních elektrod za sebou podél separační kapiláry přispělo k výraznému zvýšení citlivosti CCD v CE v porovnání s původním snímáním vodivostního signálu v jednom místě napříč kapilárou^{70,71}. Navíc toto nové uspořádání CCD umožňuje měřit vodivost při relativně nízkých frekvencích střídavého signálu (od desítek kHz po 1 MHz), což výrazně zjednoduší elektronické zpracování signálu detektoru. Zásadní výhodou CCD je fakt, že měřicí elektrody nejsou v přímém kontaktu s analyzovaným roztokem. U CCD se nerozpouští materiál

elektrody, látky se neadsorbují na povrch elektrody a neprobíhají děje, které vedou ke stárnutí elektrody. Použitím CCD v kombinaci s CE je vyřešen i problém interference silného separačního elektrického pole se signálem vodivostního detektoru⁵¹.

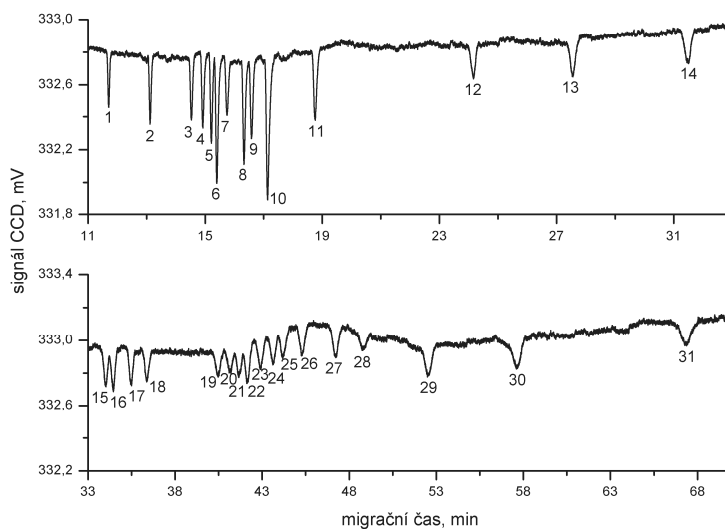
Z těchto důvodů se CCD stává jednou z nevhodnějších detekčních technik pro CE stanovení malých anorganických iontů v reálných matricích, jako je pitná⁷² a dešťová voda⁷³ nebo lidské sérum⁷⁴. Kromě stanovení anorganických iontů byly možnosti kombinace CE/CCD demonstrovány i pro analýzy organických látek neabsorbujících v UV. V literatuře byly naznačeny možnosti aplikace CE/CCD i na biochemicky významné skupiny molekul jako jsou mastné kyseliny^{75,76}, monosacharidy a disacharidy⁷⁷, aminokyseliny^{78,79}, peptidy⁸⁰ a proteiny⁸¹.

7. Praktické stanovení aminokyselin kapilární elektroforézou s bezkontaktní vodivostní detekcí

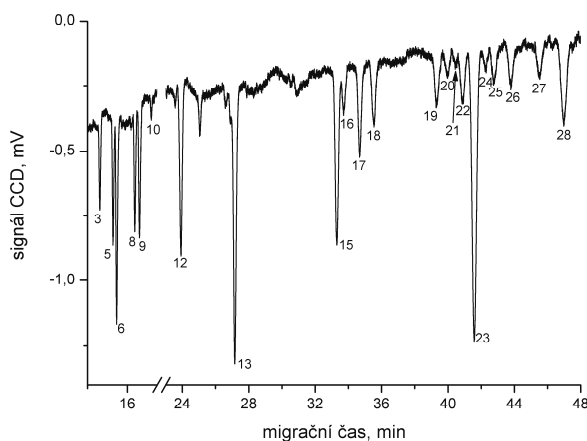
V naší laboratoři se zabýváme aplikací CE/CCD (cit.⁸²) pro stanovení celého profilu AMK v biologických tekutinách. Vysoká účinnost CE umožňuje během jedné analýzy úplné oddělení všech 20 proteinogenních AMK. Ukázkový elektroferogram modelové směsi (obr. 3) demonstruje úplnou CE separaci 20 proteinogenních AMK a dalších 11 látek, které se běžně vyskytují v biologických vzorcích. Jako optimální separační pufr se ukázala 1,7 M octová kyselina s přidávkou 0,1 % (hydroxyethyl)celulosa (w/v) o pH 2,15. Při tomto pH migrují AMK v elektrickém poli jako kationty. Jelikož koiontem ke kladně nabitým AMK jsou vysoce vodivé H_3O^+ ionty separačního elektrolytu, poskytují AMK v CCD záporné píky. Poměrně vysoká koncentrace octové kyseliny v separačním elektrolytu zajišťuje dobrou pufrací kapacitu a přidavek (hydroxyethyl)celulosa chrání vnitřní povrch kapiláry před nežádoucí adsorpcí látek z biologického vzorku. LOD dosažené za optimalizovaných separačních podmínek se pohybují v rozmezí 1,5 μM pro Arg do 6,7 μM pro Asp (Arg má při pH 2,15 nejvyšší migrační rychlost, zatímco Asp nejnižší).



Obr. 2. Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru pro CE s válcovými elektrodami



Obr. 3. CE/CCD separace modelové směsi 20 proteinogenních aminokyselin a dalších 11 biogenních látek rozpuštěných v systému voda/acetonitril 1:1 (v/v) v ekvimolární koncentraci 10 μ M (Asp a 4-hydroxyprolin 15 μ M). Separační pufr: 1,7 M octová kys. + 0,1 % (hydroxyethyl)celulosa, pH 2,15. Kapilára: délka 80 cm, k detektoru 67 cm, vnitřní průměr 75 μ m. Napětí +20 kV, proud +20 μ A. Hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 20 s. Identifikace píkú: 1 ethanolamin, 2 cholin, 3 kreatinin, 4 β -Ala, 5 ornithin, 6 Lys, 7 4-aminomáselná kys., 8 Arg, 9 His, 10 methylhistidin, 11 karnitin, 12 Gly, 13 Ala, 14 2-aminomáselná kys., 15 Val, 16 Ile, 17 Leu, 18 Ser, 19 Thr, 20 Asn, 21 Met, 22 Trp, 23 Gln, 24 citrulin, 25 Glu, 26 Phe, 27 Tyr, 28 Pro, 29 cystin, 30 Asp, 31 4-hydroxyprolin

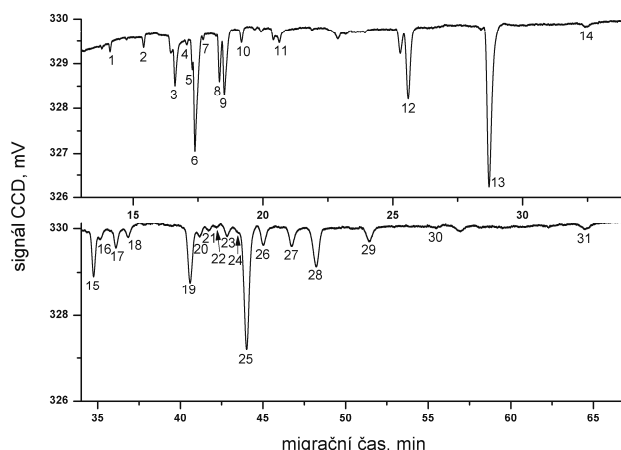


Obr. 4. CE/CCD elektroferogram krevní plasmy po deproteinizaci acetonem 1:1 (v/v); hydrodynamické dávkování 50 mbar po dobu 6 s. Experimentální podmínky a identifikace píkú stejné jako v obr. 3

Tato citlivost CE/CCD je dostatečná pro stanovení všech 20 proteinogenních AMK v krevní plasmě⁸³ i plodové vodě⁸⁴, viz obr. 4 a obr. 5.

Popsaná technika CE/CCD umožňuje citlivé stanovení celého profilu AMK v jejich volné formě, ve které se

vyskytují v živých organismech. Plasma nebo plodová voda jsou pouze deproteinizovány přidávkem organického rozpouštědla a poté přímo dávkovány do separační kapiláry. Tím odpadá zdlouhavá úprava vzorku, kterou vyžaduje použití fotometrické popř. fluorescenční detekce, a úplnou



Obr. 5. CE/CCD elektroferogram plodové vody po deproteinizaci acetonitrilem 1:1 (v/v); experimentální podmínky a identifikace píků stejné jako v obr. 3

analýzu je možné provést do 60 minut. Navíc CE/CCD umožňuje použití separačních pufrů o vysoké koncentraci složek, což má kladný vliv na CE separaci biologických tekutin s velkým přebytkem anorganických iontů.

8. Závěr

Moderní přístroje CE jsou vhodnou alternativou jed nouúčelových analyzátorů při stanovení AMK v biologických vzorcích. Problém CE analýzy AMK je především v nedostatku vhodných chromoforů a fluoroforů ve struktuře AMK. Pro použití rutinních detekčních technik založených na fotometrické detekci v UV oblasti a detekci fluorescenční je nutné AMK derivatizovat a poté stanovovat ve formě absorbujících derivátů. Naopak použití CCD umožňuje citlivé stanovení AMK v jejich volné nativní formě, ve které se vyskytují v živých organismech. Citlivost spojení CE a CCD je dostatečná pro analýzu celého profilu proteinogenních AMK v biologických tekutinách s tím, že není nutné provádět složitou úpravu biologického materiálu před vlastní CE analýzou.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou ČR (grant č. 203/04/0519 a č. 203/03/D094) a MŠMT České republiky (výzkumný záměr č. MSM0021620814).

Seznam zkratk proteinogenních aminokyselin

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina
Gln	glutamin

Glu	glutamová kyselina
Gly	glycin
His	histidin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
Val	valin

LITERATURA

- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W.: *Harperova biochemie*. H & H, Praha 1998.
- Devlin T. M.: *Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, New York 1992.
- Sriver C., Beaudet A., Sly W. S., Valle D.: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, Vol. 1. McGraw Hill, New York 1995.
- Boulat O., McLaren D. G., Arriaga E. A., Chen D. D. Y.: *J. Chromatogr., B* 754, 217 (2001).
- Šenk P., Kozák L., Foret F.: *Electrophoresis* 25, 1447 (2004).
- Roe C. D., Roe D. S.: *Mol. Genet. Metab.* 68, 243 (1999).
- Moore S., Spackman D. H., Stein W. H.: *Anal. Chem.* 30, 1185 (1958).
- Poinsot V., Bayle C., Couderc F.: *Electrophoresis* 24, 4047 (2003).

9. Prata C., Bonnafous P., Fraysse N., Treilhou M., Poin-sot V., Couderc F.: *Electrophoresis* 22, 4129 (2001).
10. Smith J. T.: *Electrophoresis* 20, 3078 (1999).
11. Smith J. T.: *Electrophoresis* 18, 2377 (1997).
12. Stryer L.: *Biochemistry*, 2. vyd. CBS Publishers and Distributors, India 1986.
13. Lide D. R.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 83. vyd. CRC Press, New York 2002.
14. Underberg W. J. M., Waterval J. C. M.: *Electrophoresis* 23, 3922 (2002).
15. Waterval J. C. M., Lingeman H., Bult A., Underberg W. J. M.: *Electrophoresis* 21, 4029 (2000).
16. Mikuš P., Kaniansky D.: *Chem. Listy* 94, 347 (2000).
17. Li S. F. Y.: *Capillary Electrophoresis – Principles, Practise and Applications*. Elsevier, Amsterdam 1994.
18. Bergquist J., Vona M. J., Stiller C. O., Oconnor W. T., Falkenberg T., Ekman R.: *J. Neurosci. Methods* 65, 33 (1996).
19. Skocir E., Prosek M.: *Chromatographia* 41, 638 (1995).
20. Chan K. C., Muschik G. M., Issaq H. J.: *Electrophoresis* 21, 2062 (2000).
21. Kelly M. T., Fabre H., Perrett D.: *Electrophoresis* 21, 699 (2000).
22. Floyd P. D., Moroz L. L., Gillette R., Sweedler J. V.: *Anal. Chem.* 70, 2243 (1998).
23. Shippy S. A., Jankowski J. A., Sweedler J. V.: *Anal. Chim. Acta* 307, 163 (1995).
24. Wan H., Blomberg L. G.: *J. Chromatogr. Sci.* 34, 540 (1996).
25. Kang J. W., Yang Y. T., You J. M., Ou Q. Y.: *J. Chromatogr., A* 825, 81 (1998).
26. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr.* 653, 93 (1993).
27. Zhao S., Feng Y., LeBlanc M. H., Liu Y. M.: *J. Chromatogr., B* 762, 97 (2001).
28. Zhao S., Liu Y. M.: *Electrophoresis* 22, 2769 (2001).
29. Rocher C., Bert L., Robert F., Trouvin J. H., Renaud B., Jacquot C., Gardier A. M.: *Brain Res.* 737, 221 (1996).
30. Tivesten A., Lundqvist A., Folestad S.: *Chromatographia* 44, 623 (1997).
31. Chu Q. Y., Evans B. T., Zeece M. G.: *J. Chromatogr., B* 692, 293 (1997).
32. Oguri S., Yokoi K., Motohase Y.: *J. Chromatogr., A* 787, 253 (1997).
33. Zhang L. L., Yeung E. S.: *J. Chromatogr., A* 734, 331 (1996).
34. Causse E., Siri N., Arnal J. F., Bayle C., Malatray P., Valdiguie P., Salvayre R., Couderc F.: *J. Chromatogr., B* 741, 77 (2000).
35. Qu Y., Li Y., Vandenbussche E., Vandesande F., Arc-kens L.: *Brain Res. Protocol* 7, 45 (2001).
36. Silva E., Quinones B., Freund N., Gonzalez L. E., Hernandez L.: *Brain Res.* 923, 45 (2001).
37. Tucci S., Pinto C., Goyo J., Rada P., Hernandez L.: *Clin. Biochem.* 31, 143 (1998).
38. Reynaud J. A., Malfoy B., Canesson P.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 195 (1980).
39. Malfoy B., Reynaud J. A.: *J. Electroanal. Chem.* 114, 213 (1980).
40. Luo P., Baldwin R. P.: *Electroanalysis* 4, 393 (1992).
41. Durgbanshi A., Kok W. T.: *J. Chromatogr., A* 798, 289 (1998).
42. O'Shea T. J., Greenhagen R. D., Lunte S. M., Lunte C. E., Smyth M. R., Radzik D. M., Watanabe N.: *J. Chromatogr.* 593, 305 (1992).
43. Swanek F. D., Anderson B. B., Ewing A. G.: *J. Microcolumn Sep.* 10, 185 (1998).
44. Dong Q., Jin W., Shan J.: *Electrophoresis* 23, 559 (2002).
45. Dong Q., Wang X., Zhu L., Jin W.: *J. Chromatogr., A* 959, 269 (2002).
46. Weng Q., Jin W.: *Electrophoresis* 22, 2797 (2001).
47. Luo P., Zhang F., Baldwin R. P.: *Anal. Chem.* 63, 1702 (1991).
48. Ye J., Baldwin R. P.: *Anal. Chem.* 66, 2664 (1994).
49. Gooding J. J., Hibbert D. B., Yang W.: *Sensors* 1, 75 (2001).
50. Wang A., Fang Y.: *Electrophoresis* 21, 1281 (2000).
51. Kappes T., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 12, 165 (2000).
52. Xiong X., Li S. F. Y.: *J. Chromatogr., A* 835, 169 (1999).
53. Bruin G. J. M., van Asten A. C., Xu X., Poppe H.: *J. Chromatogr.* 608, 97 (1992).
54. Lee Y. H., Lin T. I.: *J. Chromatogr., A* 680, 287 (1994).
55. Žunić G., Jelić-Ivanović Z., Čolić M., Spasić S.: *J. Chromatogr., B* 772, 19 (2002).
56. Ma Y., Zhang R., Cooper C. L.: *J. Chromatogr.* 608, 93 (1992).
57. Arce L., Segura Carretero A., Rios A., Cruces C., Fernandez A., Valcarcel M.: *J. Chromatogr., A* 816, 243 (1998).
58. Crowder M. W., Numan A., Haddadian F., Weitzel M. A., Danielson : *Anal. Chim. Acta* 384, 127 (1999).
59. Chen Z. L., Warren C. R., Adams M. A.: *Chromatographia* 51, 180 (2000).
60. Ackermans M. T., Everaerts F. M., Beckers J. L.: *J. Chromatogr.* 549, 345 (1991).
61. Katzmayer M. U., Klampfl C. W., Buchberger W.: *J. Chromatogr., A* 850, 355 (1999).
62. Zemann A. J.: *Trends Anal. Chem.* 20, 346 (2001).
63. Zemann A. J.: *Electrophoresis* 24, 2125 (2003).
64. Kubáň P., Hauser P. C.: *Electroanalysis* 16, 2009 (2004).
65. Guijt R. M., Evenhuis C. J., Macka M., Haddad P. R.: *Electrophoresis* 25, 4032 (2004).
66. Geraldo J., Brito-Neto A., da Silva J. A. F., Blanes L., do Lago C. L.: *Electroanalysis* 17, 1198 (2005).
67. Zemann A. J., Schnell E., Volgger D., Bonn G. K.: *Anal. Chem.* 70, 563 (1998).
68. da Silva J. A. F., do Lago C. L.: *Anal. Chem.* 70, 4339 (1998).
69. Tůma P., Opekar F., Jelínek I.: *Electroanalysis* 13,

- 989 (2001).
70. Gaš B., Demjaněnko M., Vacík J.: *J. Chromatogr.* 192, 253 (1980).
 71. Gaš B., Vacík J.: *Chem. Listy* 74, 652 (1980).
 72. Kubáň P., Karlberg B., Kubáň P., Kubáň V.: *J. Chromatogr., A* 964, 227 (2002).
 73. Rocha F. R., da Silva J. A. F., do Lago C. L., Fornaro A., Gutz I. G. R.: *Atmos. Environ.* 37, 105 (2003).
 74. da Silva J. A. F., Ricelli N. L., Carvalho A. Z., do Lago C. L.: *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 265 (2003).
 75. Oliveira M. A. L., do Lago C. L., Tavares M. F. M., da Silva J. A. F.: *Quim. Nova* 26, 821 (2003).
 76. Surowiec I., Kaml I., Kenndler E.: *J. Chromatogr., A* 1024, 245 (2004).
 77. Carvalho A. Z., da Silva J. A. F., do Lago C. L.: *Electrophoresis* 24, 2138 (2003).
 78. Coufal P., Zuska J., van de Goor T., Smith V., Gaš B.: *Electrophoresis* 24, 671 (2003).
 79. Tanyanyiwa J., Schweizer K., Hauser P. C.: *Electrophoresis* 24, 2119 (2003).
 80. Baltussen E., Guijt R. M., van der Steen G., Laugere F., Baltussen S., van Dedem G. W. K.: *Electrophoresis* 23, 2888 (2002).
 81. Abad-Villar E. M., Tanyanyiwa J., Fernández-Abedul M. T., Costa-García A., Hauser P. C.: *Anal. Chem.* 76, 1282 (2004).
 82. Gaš B., Zuska J., Coufal P., van de Goor T.: *Electrophoresis* 23, 3520 (2002).
 83. Samcová E., Tůma P.: *Electroanalysis* 18, 152 (2006).
 84. Tůma P., Samcová E., Andělová K.: *J. Chromatogr., B* 839, 12 (2006).

P. Tůma and E. Samcová (*Centre of Biomedical Sciences, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague 10, Czech Republic*): **Determination of Free Amino Acids in Biological Fluids Using Capillary Electrophoresis**

Determination of amino acids (AA) in biological fluids plays an important role in clinical research. Attention has been focused on separation methods offering a high separation efficiency, small volume of injected sample and short time of analysis. Capillary electrophoresis (CE) is one of the analytical methods that meets all these demands and, in addition, allows to overcome some technical obstacles in analysis of biological materials. This article provides a review of recent progress in the CE analysis of proteinogenic AAs in biological fluids. Principles and applications of various CE detection techniques are discussed, including those based on direct UV photometry, fluorimetry, indirect photometry, electrochemistry and conductivity. It is shown that the contactless conductivity detection (CCD) is superior to other detection techniques in the CE analysis of the whole profile of proteinogenic AAs occurring in their native forms in biological fluids. Apart from a high sensitivity, the CE/CCD method makes it possible to avoid complicated pretreatment of biological samples.