

## DERIVATIZACE AMINOKYSELIN, PEPTIDŮ A PROTEINŮ PRO LASEREM INDUKOVANOU FLUORESCENČNÍ DETEKCI V KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZE

MARKÉTA RYVOLOVÁ\*, PETR TÁBORSKÝ, PATRIK VRÁBEL, JOSEF HAVEL a JAN PREISLER

*Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno  
preisler@chemi.muni.cz*

Došlo 27.5.05, přepracováno 13.12.05, přijato 27.12.05.

Klíčová slova: fluorescenční detekce, rhodamin B isothiokyanát, derivatizace, kapilární elektroforéza, laser

### Úvod

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda využitelná pro široké spektrum analytů – od jednoduchých anorganických iontů<sup>1</sup> až po složité biomolekuly<sup>2,3</sup>. Mezi největší výhody této metody patří především její vysoká účinnost, nízká spotřeba chemikálií, dávkovaných vzorků a krátké časy analýz. Lze ji navíc spojit s mnoha druhy detektorů; mezi běžně používané patří např. UV/VIS absorpční detektor<sup>4,5</sup>, elektrochemický<sup>6,7</sup>, vodivostní<sup>8</sup> a MS detektor<sup>9,10</sup>. K nejcitlivějším způsobům detekce vůbec náleží laserem indukovaná fluorescenční (LIF) detekce<sup>11,12</sup>.

LIF detekce v kombinaci s kapilární zónovou elektroforézou (CZE) umožňuje dosažení extrémně nízkých detekčních limitů, pohybujících se až na úrovni jednotlivých molekul<sup>13–16</sup>. Možnost využití této metody je ale výrazně omezena fluorescenčními vlastnostmi jednotlivých analytů v kombinaci s použitým zdrojem buďícího záření. U biologicky aktivních látek, jako jsou např. aminokyseliny, peptidy nebo proteiny, které vykazují přirozenou fluorescenci pouze v UV oblasti spektra, lze pro buzení jejich nativní fluorescence využít např. Ar<sup>+</sup> laser s přechodem při 275,4 nm (cit.<sup>11</sup>), neodymem dopovaný granátový (Nd:YAG) laser s vlnovou délkou 266 nm (cit.<sup>17</sup>) a další.

Pokud analyt nemá vhodné spektrální vlastnosti, aby bylo možné sledovat jeho přirozenou fluorescenci nebo vyžaduje použití nákladného UV laseru, lze jej modifikovat a začlenit do jeho struktury fluorofor, jehož fluorescen-

ce se deteguje. Časté je použití derivatizačních barviv vykazujících fluorescenci ve viditelné oblasti spektra, kde existuje široká škála laserů využitelných jako zdroje excitačního záření. Pro LIF se kromě různých přechodů Ar<sup>+</sup> laseru s nejpoužívanějším přechodem 488 nm (cit.<sup>18</sup>), vhodným pro excitaci fluoresceinu, a He-Ne laseru, využívá také celá řada pevnolátkových, resp. diodových laserů, které se díky nízké ceně a snadné dostupnosti dočkaly velkého rozšíření. Příkladem relativně dostupného pevnolátkového laseru je diodově pumpovaný Nd:YAG laser s násobenou frekvencí emitující záření o vlnové délce 532 nm (cit.<sup>19</sup>).

Pro derivatizaci aminoskupin peptidů (resp. proteinů) jsou nejvhodnější dvě skupiny derivatizačních činidel; isothiokyanáty a sukcinimidylestery. Jejich reakcí s aminoskupinou analytu vzniká z isothiokyanátu derivát thioamočoviny nebo ze sukcinimidylesteru peptidová vazba. Reakce je velmi závislá na pH, protože aminoskupina analytu musí být deprotonovaná, což při derivatizaci *N*-koncových aminoskupin vyžaduje pH alespoň 7,5 a při derivatizaci  $\epsilon$ -aminoskupiny lysinu pH 8–10 (cit.<sup>20</sup>).

Jak již bylo řečeno, je možno kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí dosáhnout velmi nízkých mezí detekce, ale ve většině případů jsou tyto hodnoty zjištěny analýzou derivátu, který byl připraven v daleko vyšší koncentraci (řádově  $\mu$ M) a následně zředěn<sup>13,21</sup>. Takto získané meze detekce mají význam v mnoha metodách odvozených od luminiscenční spektroskopie (fluorescenční imunoanalýza, fluorescenční rezonanční energetický přenos, průtoková cytometrie, atd.), ale pokud jde o přímou derivatizaci vzorků o nízkých koncentracích, jsou dosažené meze detekce výrazně horší, protože reakce zdaleka neprobíhá kvantitativně<sup>22</sup>.

Cílem této práce bylo najít vhodný postup derivatizace aminoskupin biomolekul a jejich následné detekce metodou LIF, ověřit jej a zjistit reálné meze detekce pro případné využití v praxi.

### Experimentální část

#### Chemikálie a činidla

Rhodamin B, rhodamin B-isothiokyanát (RBITC), isoleucin, glutamová kyselina, lidský angiotensin I a bradykinin (vše Sigma Aldrich, Německo); hovězí insulin (USB, USA); citronová kyselina a hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, Česká republika); aceton a methanol (Scharlau, Německo). Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. Voda byla redestilována v křemenné aparatuře firmy Heraeus (Německo).

\* Markéta Ryvolová získala 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2005 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie

## Kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescenční detekcí

Experimenty byly provedeny na přístroji pro kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescenční detekcí sestaveném na Katedře analytické chemie PřF MU Brno<sup>19</sup>. Zdrojem excitačního záření byl Nd:YAG laser s násobenou frekvencí (532 nm) a výkonem 5 mW; model DPGL-3005F vyrobený firmou Casix (Čína). Laserový paprsek byl skleněnou čočkou dodanou firmou Edmund Scientific (USA) s ohniskovou vzdáleností 10 mm zaostřen do středu křemenné kapiláry vyrobené firmou Polymicro Technologies (USA). Vnitřní průměr kapiláry byl 50  $\mu\text{m}$ , vnější průměr byl 375  $\mu\text{m}$ , efektivní délka 30 cm a celková délka 37 cm. Fluorescence analytu byla objektivem mikroskopu s šedesátinásobným zvětšením, rovněž od společnosti Edmund Scientific (USA), směřována na fotonásobič model R6356 od firmy Hamamatsu Photonics (Japonsko). Rozptýlené laserové záření bylo eliminováno použitím stínítek a optických filtrů s transmitancí v oblasti 560–660 nm dodaných společností Edmund Scientific Optics (USA). Signál z fotonásobiče byl 16 bitovým A/D převodníkem digitalizován a vyhodnocen počítačem. Frekvence ukládání dat byla 4 Hz. Systém byl ovládán programem vytvořeným v prostředí LabVIEW v. 6.0 dodaným firmou National Instruments (USA), data byla zpracována v programu MS Excel 2000 společnosti Microsoft (USA)<sup>19</sup>.

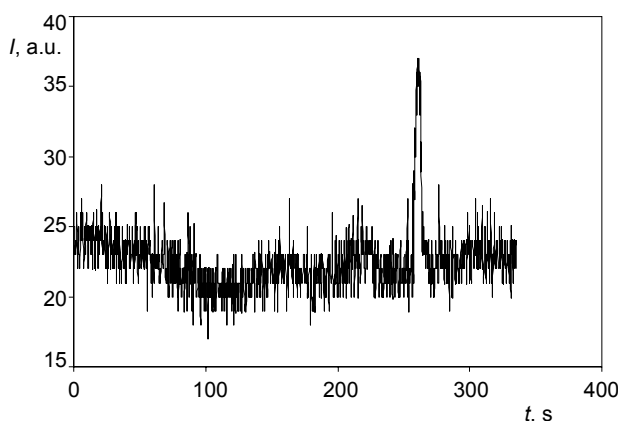
## Výsledky a diskuse

### Meze detekce

Proměřením excitačních a emisních spekter několika rhodaminových barviv (rhodamin B, rhodamin 6G, rhodamin 123 a rhodamin B-isothiokyanát) bylo zjištěno, že při použití optických filtrů, popsanych v instrumentální části, má v kyselém prostředí (0,02 mol l<sup>-1</sup> citronová kyselina v 10% MeOH, pH 2,1) nejvhodnější spektrální vlastnosti rhodamin 6G a v alkalickém prostředí (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10) rhodamin B (cit.<sup>23</sup>). Vzhledem k předpokládaným reakčním a separačním podmínkám byl pro měření meze detekce zvolen rhodamin B. Roztok barviva o koncentraci 1.10<sup>-12</sup> mol l<sup>-1</sup> v separačním elektrolytu (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10) byl analyzován kapilární elektroforézou s laserem indukovanou fluorescenční detekcí (CE LIF). Dávkování vzorku proběhlo buď hydrodynamicky po dobu  $t = 30$  s při rozdílu výšky hladin elektrolytu ve vialkách na koncích kapiláry  $\Delta h = 2$  cm nebo elektromigračně při napětí  $U = 5$  kV ( $t = 10$  s). Separační napětí bylo 10 kV.

Z elektroferogramu rhodaminu B dávkovaného hydrodynamicky byla z trojnásobku směrodatné odchylky stanovena mez detekce 2.10<sup>-13</sup> mol l<sup>-1</sup>.

Za stejných podmínek proběhlo i určení meze detekce



Obr. 1. Elektroferogram rhodamin B-isothiokyanátu (1.10<sup>-11</sup> mol l<sup>-1</sup>), hydrodynamické dávkování ( $\Delta h = 2$  cm,  $t = 30$  s), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt: 0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

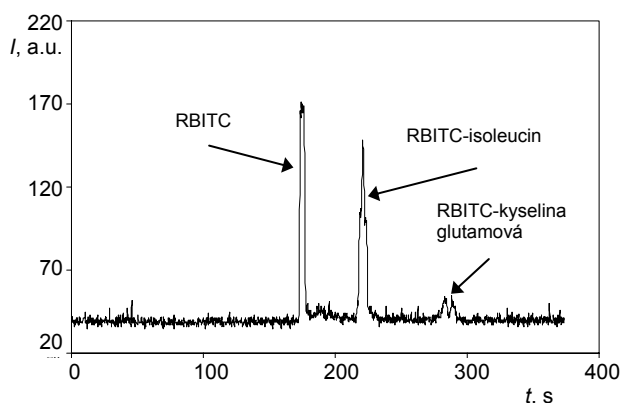
isothiokyanátu rhodaminu B. Koncentrace dávkovaného roztoku byla 1.10<sup>-11</sup> mol l<sup>-1</sup>. Výpočtem byla stanovena mez detekce tohoto barviva na 4.10<sup>-12</sup> mol l<sup>-1</sup> (obr. 1). Podobné výsledky byly získány i pro elektromigrační dávkování.

### Derivatizace aminokyselin

V literatuře bylo publikováno několik derivatizačních postupů<sup>20,24–27</sup>, na základě kterých byl navržen a optimalizován postup poskytující nejvyšší výtěžek reakce a také nejvyšší signál analyzovaných derivátů. Jako výchozí látky pro derivatizaci byly pro svou strukturní jednoduchost vybrány aminokyseliny. Protože je pro průběh reakce nutné, aby aminoskupina byla deprotonovaná, probíhala modifikace v alkalickém prostředí. Byla připravena směs aminokyselin (isoleucinu a glutamové kyseliny) ve fosforečnanu (0,02 mol l<sup>-1</sup>; pH 10); koncentrace každé z aminokyselin ve směsi byla 1.10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup>. 50  $\mu\text{l}$  této směsi bylo derivatizováno 50  $\mu\text{l}$  roztoku činidla RBITC o koncentraci 2.10<sup>-4</sup> mol l<sup>-1</sup> v acetonu. Směs byla inkubována při 50 °C po dobu 5 h (cit.<sup>24</sup>). Před analýzou byla směs ředěna separačním elektrolytem (0,02 mol l<sup>-1</sup> fosforečnan s 10% MeOH; pH 10) 1:1000. Dávkováno bylo elektromigračně ( $t = 10$  s,  $U = 5$  kV) a separační napětí bylo 10 kV.

Na obr. 2 jsou vidět jak píky modifikovaných aminokyselin, tak i výrazný pík nezreagovaného barviva. Důvodem vzniku více produktů, jak je patrné zejména u derivátu glutamové kyseliny, je použité činidlo, které je směsí dvou isomerů (5- a 6- RBITC). Z isoleucinu vznikají pravděpodobně také dva deriváty, které však od sebe nejsou odděleny. Při derivatizaci malých aminosloučenin se tedy může negativně projevit nízká kvalita činidla; dle našich zkušeností se lze s nečistotami v činidle nebo s jeho výskytem setkat i u tzv. chromatograficky čistých činidel.

Pokud vyjdeme ze zjednodušujícího předpokladu, že

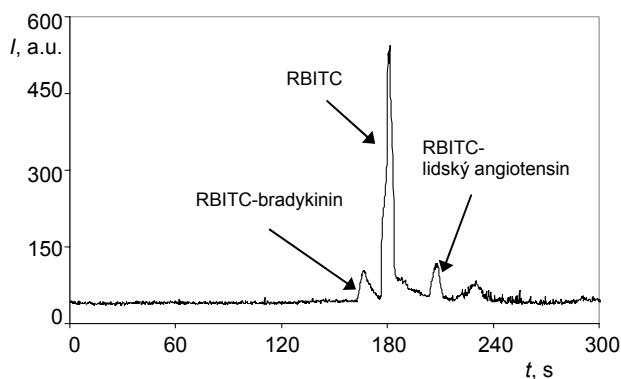


Obr. 2. Separace aminokyselin derivatizovaných rhodamin B-isothiokyanátem ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

intenzita fluorescence RBITC se po navázání na aminokyselinu výrazně nezmění, lze z poměrů ploch jednotlivých píků usoudit, že asi 60 % činidla zůstalo nezreagováno a přibližně 40 % je ve směsi přítomno ve formě derivátu. Rozdílnou velikost plochy píků derivátů isoleucinu a glutamové kyseliny lze vysvětlit různou reaktivitou aminokyselin s RBITC; derivatizace isoleucinu tedy probíhá snáze.

#### Derivatizace peptidů

Dalším krokem byla derivatizace a separace peptidů, která probíhala podle stejného postupu a ve stejném separačním pufru jako modifikace aminokyselin. Jako modelové vzorky byly vybrány lidský angiotensin I a bradykinin. Bylo derivatizováno 50  $\mu\text{l}$  směsi peptidů ve fosforečnanu (koncentrace jednotlivých peptidů byly  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ )



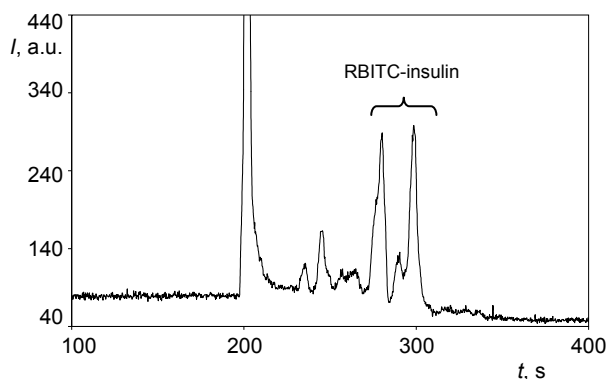
Obr. 3. Separace peptidů derivatizovaných rhodamin B-isothiokyanátem ( $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10

roztokem 50  $\mu\text{l}$  barviva o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  v acetonu. Směs byla před separací ředěna v poměru 1:1000.

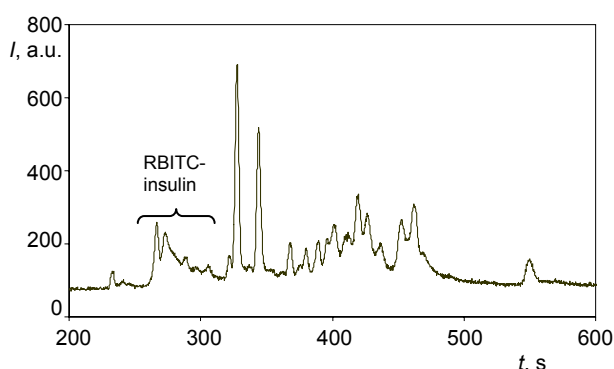
Z obr. 3 je patrné, že CZE LIF lze využít k rychlému a citlivému stanovení těchto peptidů díky jejich rozdílným migračním časům. Rozdíl v migraci způsobuje asparagová kyselina, přítomná ve struktuře angiotensinu, jejíž boční řetězec s disociovanou karboxylovou skupinou vnáší do molekuly RBITC-angiotensinu navíc jeden záporný náboj. V porovnání s aminokyselinami není pozorováno žádné štěpení píků derivátů, což lze vysvětlit tím, že v tomto případě je pro rychlost migrace určující spíše velikost molekuly peptidu a nikoli molekuly činidla, jak tomu bylo u aminokyselin.

#### Derivatizace insulínu

Pro derivatizaci proteinů byl jako jeden z menších a jednodušších vybrán hovězí insulin. Pro modifikaci byl použit stejný postup jako v předchozích případech. 50  $\mu\text{l}$  insulínu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  bylo modifikováno 50  $\mu\text{l}$  RBITC o koncentraci  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ . Směs byla ředěna 1000 $\times$ . Separací účinnost CZE proteinů snižuje především jejich sorpce na stěnu kapiláry. Tento jev je omezen např. při extrémních hodnotách pH (cit.<sup>28,29</sup>). Proto byly v této práci testovány možnosti separace jak v alkalickém, tak v kyselém separačním elektrolytu. V alkalické oblasti byl použit opět fosforečnanový pufr ( $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  v 10% MeOH) o pH 10 a v kyselém oblasti byl testován citrátový pufr ( $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  v 10% MeOH) o pH 2,6. Separací napětí bylo pro fosforečnan 10 a pro citrát 15 kV. Elektroferogramy obou separací ukazují obr. 4 a 5. Je patrné, že vzniká více produktů, což je pravděpodobně způsobeno především přítomností více vazebných míst v molekule insulínu. Ten se skládá ze 2 řetězců spojených disulfidovými můstky a navíc obsahuje lysin, takže má teoreticky tři možná vazebná místa. Současně se může



Obr. 4. Separace insulínu derivatizovaného rhodamin B-isothiokyanátem v alkalickém prostředí ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektromigrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí: 10 kV, separační elektrolyt:  $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  fosforečnan v 10% MeOH; pH 10



Obr. 5. Separace insulinu derivatizovaného rhodamin B-isothiokyanátem v kyselém prostředí ( $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ), elektro-migrační dávkování ( $U = 5 \text{ kV}$ ,  $t = 10 \text{ s}$ ), separační napětí:  $15 \text{ kV}$ , separační elektrolyt:  $0,04 \text{ mol l}^{-1}$  citrónová kyselina v 10% MeOH; pH 2,6

insulin rozpadat, případně agregovat, což je jedním z důvodů snížení citlivosti analýzy. Z obr. 5 je také vidět, že v kyselém prostředí se činidlo rozpadá daleko více, v důsledku čehož je elektroferogram mnohem komplikovanější.

#### Srovnání mezi detekce

Jak již bylo řečeno, lze mez detekce derivatizační reakce určit dvěma způsoby. Jedním z nich je derivatizace koncentrovaného roztoku vzorku a jeho následné ředění. Druhým způsobem je přímá derivatizace vzorků o nízkých koncentracích. Tento způsob je z analytického hlediska významnější především pro analýzu reálných vzorků, ale takto zjištěné meze detekce jsou o několik řádů vyšší<sup>22</sup>. Je to pravděpodobně způsobeno zejména rychlostí derivatizační reakce, která je ve vyšších koncentracích daleko vyšší a poskytuje tedy mnohem vyšší výtěžek. V tabulce I je uvedeno srovnání těchto dvou přístupů. Hodnoty označené jako  $\text{LOD}_1$  jsou meze detekce, vypočtené z trojnásobku směrodatné odchylky šumu v okolí píku (25 s), pro roztoky derivatizované při vysokých koncentracích ( $\sim 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ ) a následně ředěné na koncentraci vhodnou pro analýzu ( $\sim 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$ ). Jako  $\text{LOD}_2$  jsou označeny nejnižší výchozí koncentrace vzorků, které se podařilo derivatizovat. Je vidět, že se tyto hodnoty

#### Tabulka I

Srovnání mezi detekce dosažených ředěním koncentrovaného derivátu ( $\text{LOD}_1$ ) a dosažených přímou derivatizací ( $\text{LOD}_2$ )

| Látka         | $\text{LOD}_1 [\text{mol l}^{-1}]$ | $\text{LOD}_2 [\text{mol l}^{-1}]$ |
|---------------|------------------------------------|------------------------------------|
| RBITC         | $4 \cdot 10^{-12}$                 | –                                  |
| Aminokyseliny | $4 \cdot 10^{-10}$                 | $5 \cdot 10^{-8}$                  |
| Peptidy       | $1 \cdot 10^{-10}$                 | $1 \cdot 10^{-7}$                  |
| Insulin       | $1 \cdot 10^{-9}$                  | $5 \cdot 10^{-7}$                  |

liši o 2 až 3 řády. Také je patrné, že čím jednodušší je molekula derivatizovaného analytu, tím nižší meze detekce je možné dosáhnout.

#### Závěr

V této práci byla charakterizována citlivost sestavy CE LIF s Nd:YAG laserem ( $\lambda = 532 \text{ nm}$ ), jejíž mez detekce pro rhodamin B-isothiokyanát byla stanovena na  $4 \cdot 10^{-12} \text{ mol l}^{-1}$ . Současně byl vybrán a ověřen postup pro derivatizaci aminokyselin, peptidů a insulinu. Separace biomolekul byla provedena v alkalickém prostředí a pro insulin také v prostředí kyselém. Bylo potvrzeno, že vzorky o vyšších koncentracích lze derivatizovat s vyšším výtěžkem, který se pohybuje kolem 50 %. Mez detekce získaná ředěním koncentrovaného vzorku je o 2–3 řády nižší než mez detekce dosažená přímou derivatizací vzorků o nízké koncentraci. Výtěžek takovéto reakce je několikanásobně nižší než v předešlém případě. Ve srovnání s mezi detekce přístroje, stanoveným rhodaminem B, zvyšuje derivatizační reakce stanovenou mez detekce o několik řádů. Toto snížení citlivosti je způsobeno především nízkým výtěžkem reakce. Dalším faktorem je vznik několika produktů reakce. U aminokyselin je vznik několika derivátů způsoben zejména přítomností dvou isomerů činidla (5-, 6- RBITC). U peptidů a proteinů hraje největší roli přítomnost více vazebných míst v molekule analytu a případně agregace nebo rozpad samotného vzorku, což způsobuje vznik většího počtu derivátů. Výsledky potvrzují, že čím jednodušší je struktura analytu, tím nižší meze detekce je možné dosáhnout.

*Autoři děkují za finanční podporu Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, výzkumný záměr č. MSM0021622415 a Grantové agentuře, projekt č. 203/03/0515.*

#### Seznam zkratk

|         |  |
|---------|--|
| a.u.    | auxiliary unit – pomocná jednotka pro vyjádření intenzity fluorescence |
| CE      | kapilární elektroforéza  |
| CZE     | kapilární zónová elektroforéza   |
| LIF     | laserem indukovaná fluorescence  |
| LOD     | limit of detection – mez detekce                                       |
| Nd:YAG  | neodymem dopovaný granátový laser                                      |
| RBITC   | rhodamin B-isothiokyanát   |
| 5-RBITC | rhodamin B-isothiokyanát s isothioskupinou vázanou v poloze 5          |
| 6-RBITC | rhodamin B-isothiokyanát s isothioskupinou vázanou v poloze 6          |

#### LITERATURA

- Kanianský D., Masár M., Marák J., Bodor R.: J. Chromatogr., A 834, 133 (1999).
- Kašicka V., Prusík Z.: Am. Lab. 26, 22-Oct (1994).

3. Foret F., Thompson T. J., Vouros P., Karger B. L., Gebauer P., Boček P.: *Anal. Chem.* **66**, 4450 (1994).
4. Terabe S., Otsuka K., Ichikawa K., Tsuchiya A., Ando T.: *Anal. Chem.* **56**, 111 (1984).
5. Walbroehl Y., Jorgenson J. W.: *J. Chromatogr., A* **315**, 135 (1984).
6. Wallingford R. A., Ewing A. G.: *Anal. Chem.* **60**, 1972 (1988).
7. Huang X., Luckey J. A., Gordon M. J., Zare R. N.: *Anal. Chem.* **61**, 766 (1989).
8. Zemann J. A.: *Trends Anal. Chem.* **20**, 346 (2001).
9. Udseth H. R., Loo J. A., Smith R. D.: *Anal. Chem.* **61**, 228 (1989).
10. Caprioli R., Moore W., Martin M., DaGue B., Wilson K., Moring S.: *J. Chromatogr., A* **480**, 247 (1989).
11. Gassmann E., Kuo J. E., Zare R. N.: *Science* **230**, 813 (1985).
12. Lee T. T., Yeung E. S.: *J. Chromatogr., A* **595**, 319 (1992).
13. Ummadi M., Weimer B.C., *J. Chromatogr., A* **964**, 243 (2002).
14. Chen D. Y., Dovichi N.J.: *J. Chromatogr., B* **657**, 265 (1994).
15. Zhao J. Y., Chen D. Y., Dovichi N. J.: *J. Chromatogr., A* **608**, 117 (1992).
16. Wu S., Dovichi N. J.: *Talanta* **39**, 173 (1992).
17. Chan K. C., Muschik G. M., Issaq H. J.: *Electrophoresis* **21**, 2062 (2000).
18. Mattusch J., Dittrich K.: *J. Chromatogr., A* **680**, 279 (1994).
19. Vrábel P.: *Diplomová práce*. Masarykova univerzita, Brno 2003.
20. www.molecularprobes.com, staženo 15. listopadu 2004.
21. Banks P. R.: *Trends Anal. Chem.* **17**, 612 (1998).
22. Bardelmeijer H. A., Lingeman H., de Ruiter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr., A* **807**, 3 (1998).
23. Peš O.: *Bakalářská práce*. Masarykova univerzita, Brno 2004.
24. Takizawa K., Nakamura H.: *Anal. Sci.* **14**, 925 (1998).
25. Šlais K., Horká M., Nováčková J., Friedl Z.: *Electrophoresis* **23**, 1692 (2002).
26. Gök E., Olgaz S.: *J. Fluorescence* **14**, 203 (2004).
27. Román D. A., Carretero A. S., Blanco C. C., Gutiérrez A. F.: *Biomed. Chromatogr.* **18**, 422 (2004).
28. Zhu M., Rodriguez R., Hansen D., Wehr T.: *J. Chromatogr., A* **513**, 123 (1990).
29. McCormick R.M., *Anal. Chem.* **60**, 2322 (1988).

**M. Ryvolová, P. Táborský, P. Vrábel, J. Havel, and J. Preisler** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Derivatization of Amino Acids, Peptides and Proteins for Laser-Induced Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis**

This work is focused on application of laser-induced fluorescence detection for analysis of amino acids, peptides and proteins. The measurements were performed on a home-built instrument with a frequency-doubled Nd:YAG laser (532 nm) as excitation source. Rhodamine B isothiocyanate was used for derivatization of model samples. Major differences between the detection limits of analytes derivatized at high and low concentrations were presented. Difficulties associated with derivatization of complex samples and their negative influence on the limits of detection were also demonstrated.