

DERIVATIZAČNÉ REAKCIE V KAPILÁRNEJ ELEKTROFORÉZE AMINOKYSELÍN

PETER MIKUŠ a DUŠAN KANIANSKY

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: pmikus@fns.uniba.sk

Došlo dňa 11. X.1999

Kľúčové slová: aminokyseliny, derivatizácia, kapilárna elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia a zhodnotenie derivatizačných metód
 - 2.1. Tvorba izoindolov
 - 2.2. Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov
 - 2.3. Tvorba sulfonamidov
 - 2.4. Tvorba amidov
 - 2.5. Tvorba uretánov
 - 2.6. Tvorba *N*-aryl aminokyselín
 - 2.7. Menej používané derivatizačné reakcie
3. Záver

1. Úvod

Zwitterionický charakter, ale najmä absencia chromofórov, fluorofórov, alebo elektroforórov v molekulách väčšiny aminokyselín¹ (AA), ktoré by umožnili ich citlivú a selektívnu detekciu, majú za následok, že AA sa technikami kapilárnej elektroforézy (CE) analyzujú prevažne vo forme derivátov (viď napríklad prehľadné práce z posledného obdobia²⁻⁷). Výber derivatizačnej reakcie, vhodnej CE techniky (kapilárna zónová elektroforéza (CZE), micelárna elektrokinetická chromatografia (MEKC), kapilárna elektrochromatografia (CEC), kapilárna izotachoforéza (CITP)) a spôsobu detekcie (predkolónová, pokolónová, alebo spojená s reakciou priamo v kolóne) sú vzájomne úzko previazané.

Derivatizácia AA priamo v CE kolóne (in-column derivatizácia^{4,5,8-11}) je veľmi atraktívna (derivatizácia a separácia prebiehajú súčasne, jednoduché experimentálne usporiadanie a znížené nároky na manipuláciu so vzorkou). Na druhej strane, reprodukovateľnosť derivatizácie realizovanej týmto spôsobom je ovplyvnená injektážou vzorky a činidla, aplikovaným napätím, reakčným časom a inými menej závažnými faktormi^{9,11}. Derivatizácia v on-line kombinácii s CE separáciou je prakticky nevyhnutná v monitoringu rýchlych zmien AA vo vzorkách odobratých zo živých organizmov¹².

V tejto práci je venovaná pozornosť derivatizačným reakciám AA najmä z hľadiska reakčných podmienok, chemickej povahy vznikajúcich derivátov a ich detekcie naväzujúcej na CE separáciu.

2. Charakterizácia derivatizačných reakcií a metód

Prevažná časť derivatizačných činidiel používaných v CE aminokyselín (tabuľka I) poskytuje deriváty, v ktorých je príslušná funkčná skupina naviazaná na aminoskupinu AA. Tým zaniká zwitterionický charakter väčšiny AA a deriváty s voľnou karboxylovou skupinou sú separovateľné v anionickom režime. V menšej miere sa v CE aminokyselín využívajú derivatizačné reakcie, ktorých sa zúčastňuje karboxylová skupina AA (vznik esterov) a reakcie vedúce k vzniku elektroneutrálnych derivátov (tiohydantoin deriváty). Pre pokolónovú detekciu môžu byť aplikované aj činidlá tvoriace s rôznymi AA identický produkt.

2.1. Tvorba izoindolov

V CE aminokyselín sa najčastejšie využívajú derivatizačné reakcie AA poskytujúce izoindoly (schéma (1) na obr. 1). Najčastejšie využívaným derivatizačným činidlom patriacim do tejto skupiny je dialdehyd kyseliny *o*-ftalovej (OPA). OPA pri laboratórnej teplote, v zásaditom prostredí a v prítomnosti tiolu reaguje prakticky okamžite s primárnymi AA (tabuľka II), za vzniku 1-alkyltio-2-alkyl-substituovaných izoindolov¹³. Reakciu sprevádza len obmedzená tvorba detekciu rušiacich interferentov a preto má predpoklady na využitie k derivatizácii AA priamo v separačnej kapiláre^{8,9,11,14} v spojení s veľmi citlivou fluorescenčnou alebo elektrochemickou detekciou.

Nižšia stabilita derivátov, tvorba zmesných a viacnásobne derivatizovaných produktov a nepoužiteľnosť k detekcii sekundárnych AA (cit.^{13,15}) sú obmedzujúce faktory použitia OPA v CE. K zvýšeniu stability vznikajúcich produktov sa využívajú nukleofily alternatívne k 2-merkaptopetanolu (kyselina 3-merkaptopropiónová, *N*-acetyl-L-cystein, Boc-L-cystein, *N*-acetyl-D-penicilamin, *N*-izobutyryl-L-cystein, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-tio-β-D-glukopyranóza, HSO₃⁻, CN⁻)^{11,15-17}. Riešením je aj náhrada OPA novými činidlami (naftalén-2,3-dikarboxyaldehyd (NDA); 3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolín-karboxyaldehyd)¹⁸⁻²⁰.

2.2. Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov

Skupina činidiel poskytujúca tiokarbamyl a následne tiohydantoin deriváty AA (schéma (2) na obr. 1) má v molekule reaktívnu izotiokyanátovú funkčnú skupinu. Činidlá reagujú nielen s voľnou aminoskupinou, ale aj s OH⁻ iónmi, pričom rýchlostné konštanty oboch reakcií sú podobné^{21,22}. Dôsledkom tohoto sú relatívne dlhé reakčné časy a praktická využiteľnosť len v prípadoch, ak vzorka obsahuje AA v relatívne vysokých koncentráciách²³. Aj keď je pracovný postup charakteristický pre túto skupinu derivatizačných činidiel dosť zdĺhavý, v prípade derivatizácie optických izomérov môže byť jednoduchší a rýchlejší ako pri použití činidiel prináležiacich do iných skupín^{24,25}. Na rozdiel od činidiel tvoriacich s AA izo-

Tabuľka I

Derivatizačné činidlá používané v CE analýze aminokyselín

Charakteristika reakcie	Derivatizačné činidlo ^a
Tvorba izoindolov	OPA ⁹ , NDA ¹⁹ , CBQCA ²⁰ , IDA ¹⁴
Tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov	PITC ³¹ , DABITC ⁷⁴ , FITC ²² , GITC ²⁴ , NPITC ⁷⁵ , SNEIT ²⁵ , SAMBI ²⁵ , PAPITC ³⁵ , ILITC ⁷⁶ , DBD-NCS ³² , PDITC ⁷⁷ , CDITC ⁷⁸ , AITC ²⁶ , BITC ²⁶ , BEITC ²⁶ , PEITC ²⁶ , TCITC ²⁷ , TRITC ²⁹ , NBD-PyNCS ⁷⁹
Tvorba sulfonamidov	Dns-Cl ³⁴ , Dbs-Cl ⁸⁰ , BANS-Cl ³⁵
Tvorba amidov	
(i) Štiepenie sukcinimidyl esteru	SINC ⁴² , SET ⁴³ , DCCS ⁴³ , SEDC ⁴⁰ , SETC ²⁷ , NAS ³⁵ , AQC ⁴¹ , SEP ⁴⁴ , CFSE ³⁹
(ii) Reakcia acyl – halogenidu	DNB-Cl ⁴⁷ , ARC-Cl ⁴⁵ , CRA-Cl ⁴⁶ , CRP-Cl ⁴⁵
(iii) Reakcia anhydridu	DBT ⁵¹ , DAT ⁵¹ , AKC ⁸¹
Tvorba uretánov	Fmoc-Cl ⁵² , Flec-Cl ⁵³ , AEOC-Cl ⁸² , APOC-Cl ⁸³
Tvorba <i>N</i> -aryl aminokyselín	DNFB ⁶⁵ , DNFB-L-Ala ⁸⁴ , NBD-F ⁶⁴ , FDNDEA ⁶⁰ , TNBS ⁶²
Iné derivatizačné reakcie	fluorescamin ⁶⁶ , MDF ³⁵ , DTNB ⁶⁹ , pyridoxal ³⁵ , PQQ ⁶⁸ , HLTE ⁶⁷ , alkoholy (estery AA) ⁷² , Cu ²⁺ chelát ⁷⁰ , <i>N</i> - <i>tert</i> -butyloxykarbonyl deriváty ⁷³

^a Zoznam použitých skratiek

indoly môže byť pracovný postup komplikovaný aj potrebou izolovať nadbytok činidla a vedľajšie reakčné produkty^{22,26}. Na druhej strane, reaktivitu izotiokyanátovej skupiny charakterizuje dobrá selektivita k primárnym a sekundárnym aminoskupinám (fenolické hydroxyly ani imidazolové skupiny AA nereagujú). Izotiokyanáty do molekúl AA vnášajú fluorofóry (fluoresceín, tetrametylrodamin), ktoré majú vysoké molárne absorptivity a vysoké kvantové výťažky fluorescencie aj v porovnaní s derivátmi takých činidiel ako sú OPA, NDA, alebo danzyl (Dns)-Cl. Detekčné limity AA derivatizovaných fluoresceín izotiokyanátom²⁸ a tetrametylrodamin izotiokyanátom²⁹ sú na úrovni 10⁻²¹ mol (10⁻¹² mol.l⁻¹). Spojenie takejto extrémnej detekčnej citlivosti s vysokou selektivitou dáva predpoklady pre ich využitie v ultrastopovej analýze AA aj v zložitých biologických matriaciach³⁰. Prínajmenšom dve z činidiel využívajúcich tvorbu tiohydantoin derivátov majú osobitné postavenie v rámci celého súboru derivatizačných metód pre AA a peptidy. Sú to fenyl izotiokyanát³¹ (PITC) a 7-[(*N,N*-dimethylamino)sulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl izotiokyanát³², ktoré umožňujú spoľahlivú sekvenčnú analýzu proteínov a peptidov (Edmanov sekvenčný postup). Druhé zo spomínaných činidiel je alternatívou k PITC a jeho prednosťou je tvorba intenzívne fluoreskujúcich derivátov.

2.3. Tvorba sulfonamidov

Tvorbu sulfonamidov charakterizuje reakčná schéma (3) na obr. 1. Deriváty AA sú vo všeobecnosti stabilné a v CE dobre detegovateľné^{33,34}. Derivatizačný postup je jednoduchší a rýchlejší (hoci v niektorých prípadoch sú požadované vyššie teploty), napríklad v porovnaní s prípravou tiohydantoin derivátov³⁵. Potreba odstrániť potenciálne interferenty (nadbytok činidla a jeho hydrolytické produkty) však zostáva³⁶, pretože treba uvažovať riziko spontánnej reakcie nadbytku činidla (napríklad Dns-Cl) s AA derivátmi za vzniku fluoreskujúceho amidu (Dns-amidu). Nevýhodou je nižšia reakčná selektivita sulfonylchloridov. Tieto, okrem primárných a sekundárných aminoskupín, reagujú aj s fenolickými hydroxy- a imidazolovými skupinami AA, pričom reakčné výťažky veľmi závisia

od koncentrácie činidla. V kontexte s tvorbou sulfonamidov je potrebné poznamenať, že danzylácia je jedinou bežnou derivatizačnou reakciou, ktorá je vhodná na spoľahlivú detekciu a stanovenie cystínu³⁷.

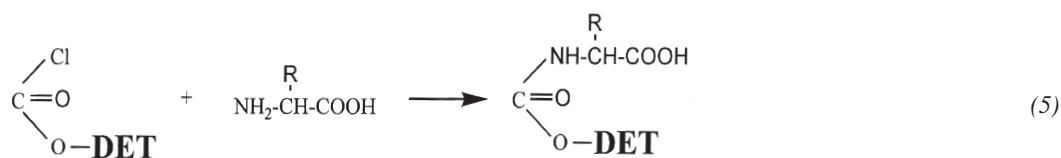
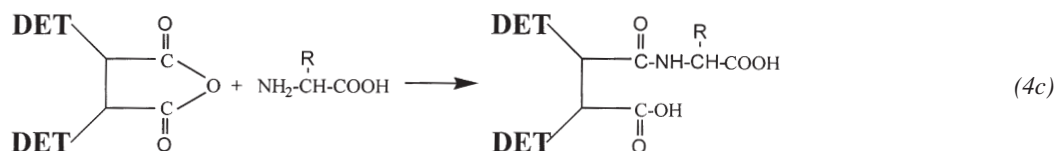
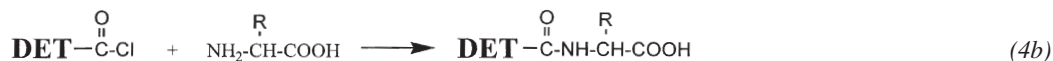
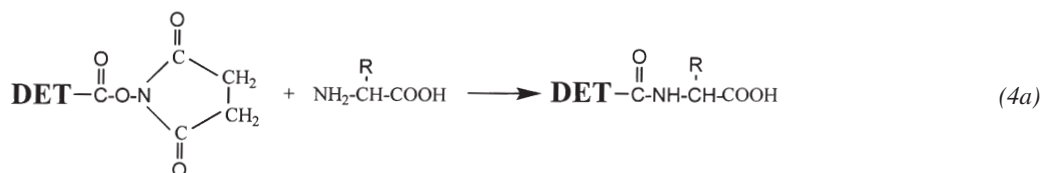
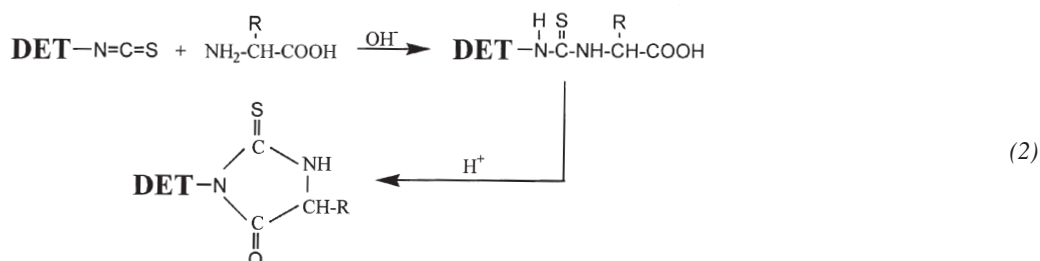
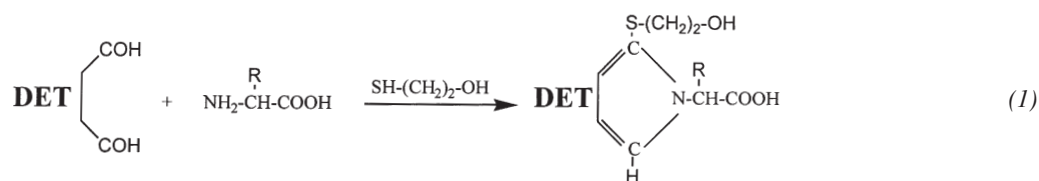
2.4. Tvorba amidov

Deriváty AA vyznačujúce sa amidickou väzbou AA na činidlo sú veľmi stabilné³⁸ a ich príprava je obvykle jednoduchá. V literatúre bola opísaná príprava amidov prínajmenšom tromi spôsobmi: (i) štiepením sukcinimidyl esteru v molekule činidla pri reakcii s AA, (ii) reakciou acyl-halogenidu a (iii) reakciou esteru s AA.

Činidlá s reaktívnou sukcinimidyl esterovou funkčnou skupinou sú najčastejšie využívané látky viažúce fluorofór na AA amidickou väzbou (schéma (4a) na obr. 1). Ich hydrolytická stabilita je daná povahou fluorofóru naviazaného na ester a napríklad, sukcinimidyl estery trikarbocyanínových farbív hydrolyzujú veľmi ľahko, kým ich izotiokyanáty sú podstatne stabilnejšie²⁷. V prípade fluoresceínu je situácia obrátená³⁹. Vo všeobecnosti je pre sukcinimidyl estery a ich AA deriváty charakteristická hydrolyza pri vyšších hodnotách pH (cit.⁴⁰). Na druhej strane, ich reakčné rýchlosti s aminoskupinami sú o viac ako jeden dekadický poriadok vyššie v porovnaní s korešpondujúcimi izotiokyanátmi (napríklad v prípade fluoresceínu) a tieto činidlá derivatizujú AA obsiahnuté vo vzorke aj na nanomolárnej koncentračnej úrovni³⁹ (o tri dekadické poriadky nižšie koncentrácie v porovnaní s príslušnými izotiokyanátmi⁴⁰). Niektoré činidlá tejto skupiny sa vyznačujú prakticky okamžitou reakciou s AA (6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidoyl karbamát⁴¹ a sukcinimido α -naftylkarbamát⁴²). Celkový derivatizačný postup s uvedenými činidlami je jednoduchý, pretože produkty rýchlo hydrolyzujúceho nadbytku činidla (vzhľadom na ich nízku fluorescenciu) nie je potrebné z reakčnej zmesi odstraňovať. Na druhej strane, interferencie hydrolytických produktov sú významné pre väčšinu ostatných derivatizačných reakcií prináležiacich do tejto skupiny^{40,43}. Prostredníctvom sukcinimidyl esteru sa za miernejších reakčných podmienok vnášajú do molekúl AA veľmi

citlivo detegovateľné fluorofóry (cyanínové^{27,40}, pyronínové⁴⁴, tiazínové⁴³, rodamínové a fluoresceínové³⁹ farbivá).

Deriváty vznikajúce reakciou acylhalogenidu s AA (schéma (4b) na obr. 1) sa vyznačujú veľmi dobrou stabilitou. De-



Obr. 1. Skupinové reakčné schémy charakterizujúce derivatizačné reakcie aminokyselín v CE. (1) Tvorba izoindolov; (2) tvorba tiokarbamyl/tiohydantoin derivátov; (3) tvorba sulfonamidov; (4) tvorba amidov: a) štiepením sukcinimidyl esteru v činidle, b) reakciou acyl-halogenidu, c) reakciou anhydridu; (5) tvorba uretánov; (6) tvorba N-aryl aminokyselín. DET = detekčne aktívna časť molekuly

Tabuľka II

Charakterizácia derivatizačných reakcií najčastejšie používaných v CE aminokyselín

Činidlo	Rýchlosť ^a	Teplota ^b	Derivatizačný režim ^c	Derivatizácia 2° AA ^d	Stabilita derivátu ^e
OPA	+++	lab	pre, post, in	–	+
NDA	++	lab	pre	–	+/++
CBQCA	++	lab	pre, in	–	++
PITC	++ ^f ; + ^g	lab/+	pre	+	++
FITC	++ ^f ; + ^g		pre	+	++
Dns-Cl	++	lab/+	pre	+	++/+++
Dbs-Cl	++	+	pre	+	+++/++
AQC	+++	lab	pre	+	++/+
SEDC	++/+++	lab	pre	+	++/+
FMOC-Cl	+++	lab	pre	+	+++
AEOC-Cl	+++	lab	pre	+	+++
DNFB	++	lab	pre	+	+++/++
NBD-F	+++		pre, post	+	+++
Fluorescamin	+++	+	pre, post, in	–	++

^a Škála rýchlosti reakcie: +++ = sekundy až minúty, ++ = desiatky minút až hodina, + = viac ako hodina; ^b reakčná teplota: + = zvýšená, lab = laboratórna; ^c derivatizácia: pre = predkolónová, post = pokolónová, in = priamo v kolóne; ^d reakcia so sekundárnymi AA: + = činidlo reaguje, – = činidlo nereaguje; ^e stabilita derivátov v roztoku: +++ = dlhodobá (dni), ++ = krátkodobá (hodiny), + = nízka (minúty); ^f tiokarbamyl; ^g tiohydantoín

tekčná citlivosť novšie pripravených fluorogénnych derivátov^{45,46} a UV žiarenie absorbujúcich dinitrobenzoyl derivátov⁴⁷ (DNB) je len priemerná. V prípade DNB je pozoruhodná derivatizácia činidlom naviazaným na pevný polymérny nosič⁴⁸. Tento spôsob derivatizácie môže byť významným prínosom v celkovom zjednodušení pracovného postupu, pretože eliminuje purifikáciu reakčnej zmesi.

Zdlhavý a náročný pracovný postup (reakcia v nevodnom prostredí⁴⁹⁻⁵¹) môže byť dôvodom, prečo sa na prípravu amidických derivátov AA používajú anhydridy len zriedkavo (schéma (4c) na obr. 1).

2.5. Tvorba uretánov

Skupinu činidiel, ktoré reagujú s AA za vzniku uretánov (schéma (5) na obr. 1) charakterizuje prakticky okamžitá reakcia a veľmi mierne reakčné podmienky^{52,53}. Najznámejším činidlom patriacim do tejto skupiny je 9-fluorenylmetylchloroformát (FMOC-Cl). Výťažok reakcie pre toto činidlo je konštantný v širokom intervale molárneho pomeru činidla k analytu⁵⁴, pričom detekčná citlivosť derivátov vo fluorescenčnom režime optickej detekcie je podobná akú majú izoindoly. Citlivosť v absorpčnom režime je vyššia a napríklad absorptivita antracénového fluorofóru 2-(9-antryl)etyl chloroformátu (AEOC-Cl) pri vlnovej dĺžke jeho absorpčného maxima (256 nm) je až 180000 l.mol⁻¹.cm⁻¹ (cit.⁵⁵) (pravdepodobne najcitlivejšia UV absorbná fotometrická detekcia AA). Na rozdiel od izoindolov, uretány sú vytvárané reakciou primárnych aj sekundárnych AA. Táto skutočnosť bola využitá pri selektívnom stanovení sekundárnych AA vedľa primárnych kombináciou OPA a FMOC-Cl (cit.⁵⁶). Ďalším významným rozdielom v porovnaní s izoindolmi je mimoriadna stabilita uretánov. Uvedené vlastnosti podmieňujú široké praktické využitie tohto derivatizačného prístupu^{52,56}. Jeho najväčšou

nevýhoda súvisí s tendenciou nadbytku činidla vytvárať hydrolytické produkty interferujúce v detekcii. Nadbytok činidla môže v niektorých prípadoch spontánne reagovať s derivátmi AA a so svojim hydrolytickým produktom v reakčnej zmesi^{57,58}. Preto v pracovnom postupe musí byť zahrnuté odstránenie interferentov extrakciou, alebo reakciou nadbytku činidla s vhodným amínom⁵⁴. Požiadavky na minimálnu koncentráciu analytu vo vzorke⁵⁹ (10⁻⁷ mol.l⁻¹) a nižšia selektivita reakcie (reakcia s imidazolom histidínu a s fenolickým hydroxylom tyrozínu) sú ďalšie, avšak aj pre väčšinu derivatizačných metód typické obmedzenia.

2.6. Tvorba N-aryl aminokyselín

Aromatická nukleofilná substitúcia (schéma (6) na obr. 1) je klasickou reakčnou schémou v derivatizácii AA. Činidlá patriace do tejto skupiny sú charakterizované vysokou stabilitou produktov⁶⁰ a reakčnou rýchlosťou ktorá ich predurčuje k použitiu len v predkolónovom derivatizačnom režime. Špecifita derivatizačnej reakcie môže závisieť od stupňa substitúcie aromatického systému činidla (napríklad, 2,4-dinitrofluorbenzén⁶¹ (DNFB) na rozdiel od 2,4,6-trinitrobenzén-sulfónovej kyseliny⁶² (TNBS) reaguje okrem tiolových aj s imidazolovými skupinami a fenolickými hydroxylmi AA). Osobitné postavenie DNFB v rámci tejto skupiny je dané jeho schopnosťou štiepiť koncovú AA v proteínoch a peptidoch⁶³. Optická a elektrochemická detekcia produktov „klasických“ činidiel tejto skupiny (DNFB a TNBS) je selektívna, ale málo citlivá v porovnaní s fluorescenčnou detekciou AA vo forme ich izoindolov, uretánov alebo amidov ak sú fluorofórnymi cianín, rodamín alebo fluoresceín.

7-Fluoro-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol⁶⁴ (NBD-F) je vhodnou alternatívou k DNFB a TNBS, pretože okrem vysokej detekčnej selektivity a citlivosti intenzívne fluoreskujúcich

Tabuľka III
Detekcia v CE najčastejšie využívaných derivátov aminokyselín

Činidlo	Detekčná technika ^a	Citlivosť ^b	Selektivita ^c	DI ^d
OPA	FD (325–350 nm), AD (UV), ED	+++,+/++	++,+/++	–
NDA	FD (442–488 nm), AD (420 nm), ED	+++,++/++	+++/,++/++	– ^e
CBQCA	FD (442 nm)	+++	+++	–
PITC	AD (UV), ED	+,+/+	+,+	+
FITC	FD (490 nm)	+++	+++	+
Dns-Cl	FD, AD (325 nm)	++,+/+	++,+/+	+
Dbz-Cl	AD (458 nm)	++/+	++/++	+
AQC	FD, AD (UV)	++,+/+	++,+/+	–
SEDC	FD (667 nm)	+++	+++	+
FMOC-Cl	FD, AD (248–265 nm)	++/++	++	+
AMOC-Cl	FD, AD (256–386 nm)	+++	+++	+
DNFB	AD (UV, VIS), ED	+,+	++/++	+
NBD-F	FD (464–488 nm)	++	+++	–
Fluorescamin	FD (780 nm)	+++	+++	+ ^f

^a FD – fluorescenčná, AD – absorpčná, ED – elektrochemická detekcia; ^b škála citlivosti detekcie: +++ = amol-ymol, ++ = fmol, + = pmol; ^c škála selektivity detekcie: +++ = vysoká, ++ = dobrá, + = nízka; ^d detekčné interferencie (DI): – = nevýznamné, + = významné v dôsledku nadbytku činidla a/alebo tvorby vedľajších reakčných produktov; ^e žltý precipitát; ^f laktóny

AA derivátov umožňuje aj jednoduchý a rýchly pracovný postup pre pred- a pokolónový derivatizačný režim, nakoľko samotné činidlo nefluoreskuje. Výhodou vnesenia málo objemného substituenta do molekuly AA (napríklad tvorba *N*-aryl AA) sú dobré elektroforetické vlastnosti derivátov⁶⁵.

2.7. Menej používané derivatizačné reakcie

V tejto časti sú diskutované derivatizačné reakcie, ktoré neprináležia do vyššie uvedených skupín a sú používané v spojení s CE separáciami AA len sporadicky.

Fluorescamin sa v CE aminokyselín nepoužíval pre jeho nevýhody (nereaguje so sekundárnymi AA, pracovný postup musí zohľadňovať nestabilitu činidla a jeho nízku rozpustnosť vo vode, vznik vedľajších produktov, ako aj požiadavku na zvýšenú teplotu)³⁵. Použitím nových detekčných prístupov (lasery s vysokou intenzitou svetelného toku) však boli spoznané prednosti tohto činidla⁶⁶ (mimoriadne vysoká detekčná citlivosť a selektivita v dôsledku neobvyklej vlnovej dĺžky použitej v excitácii (viď tabuľka III) a derivatizácie AA obsiahnutých vo vzorkách aj na veľmi nízkej koncentračnej úrovni).

Z ďalších činidiel si zasluhuje pozornosť 2-metoxi-2,4-difeny-3-(2*H*)-furanón (MDF), ktorý na rozdiel od svojich derivátov AA nefluoreskuje³⁵. Veľmi špecifické určenie má reakcia pyridoxalu s NaBT₃, ktorou sa pripravujú deriváty detegovateľne extrémne selektívnou rádiometrickou detekciou³⁵. Na druhej strane, hydrochinóny⁶⁷ a chinóny (a ich substituované analógy⁶⁸) môžu v analýze AA kombinovať výhody elektrochemickej aj optickej detekcie.

Riešenie praktických úloh často vyžaduje vysokú reakčnú selektivitu činidla. V tomto ohľade je príkladom 5,5'-ditio-bis[2-nitrobenzoová kyselina] (DTNB), ktorá umožňuje špecifickú detekciu tio-AA (cit.⁶⁹). Osobitným prípadom je použitie kovových iónov k veľmi selektívnej detekcii AA. Bolo zistené, že AA tvoriace s Cu(II) stabilné cheláty (napríklad

histidín) môžu byť v tejto forme aj veľmi selektívne detegované⁷⁰.

CE separácie esterov AA sa spájajú s využitím negatívne nabitých chirálnych selektorov, ako sú deriváty cyklodextrínov⁷¹ a crown étery⁷². *N*-*tert*-butyloxykarbonyl deriváty AA (prekursori v syntéze peptidov) boli pripravené za účelom štúdií rozdielov interakcií N-blokovaných a natívnych AA s teicoplaninom⁷³.

3. Záver

Derivatizačné činidlá a postupy v súčasnosti študované v spojení s analýzou AA technikami CE vychádzajú najmä z prác venovaných kvapalinovej chromatografii AA. Ich implementácia do CE vyžaduje obvykle len menšiu modifikáciu syntetických postupov. Na druhej strane CE ponúka do analýzy AA isté výhody súvisiace, napríklad s vysokou separačnou účinnosťou CZE a MEKC a zníženými nárokmi na množstvo analyzovanej vzorky a derivatizačného činidla. Škála derivatizačných činidiel používaných v CE sa však v porovnaní s HPLC významnejšie nezúžila. Je to dané tým, že každá z derivatizačných reakcií má svoje špecifiká a doposiaľ nebolo nájdené činidlo, ktoré by splnilo všetky, často rozporné, analytické požiadavky. Napríklad, tvorba izoindolov má prednosť v rýchlosti reakcie a v minime interferencií spojených s prítomnosťou činidla v reakčnej zmesi. Na druhej strane táto skupina činidiel reaguje výlučne s primárnymi AA. Niektoré z izotokyánátov (napríklad PITC) sú aplikovateľné pri určovaní sekvencie AA v proteínoch a peptidoch použitím CE aj keď zo všeobecného pohľadu nepredstavujú skupinu vhodnú pre univerzálne využitie (zdĺhavý derivatizačný postup, požiadavka kladená na veľkosť vzorky, interferencie činidla, derivatizácia amino aj karboxylovej funkčnej skupiny AA). Tvorba uretánov spĺňa mnohé z požiadaviek „ideálnej“ derivatizačnej metódy pre AA. Interferencie pochádzajúce od

nadbytku činidla a nižšia reakčná selektivita limitujú jeho aplikovateľnosť. AEOD-deriváty AA môžeme pravdepodobne považovať za alternatívu vedúcu k najcitlivejšej detekcii AA bežnými fotometrickými technikami založenými na absorpcii svetla. Na druhej strane, niektoré derivatizačné činidlá (DNB-Cl) poskytujú deriváty AA, ktorých detekčné vlastnosti sa navzájom líšia (absorpčné maximá primárnych a sekundárnych DNB-derivátov sú vzájomne posunuté o 26 nm). Touto cestou sa dá vniešť do detekcie AA prvok selektivity. Sukcinimidyl estery sú vhodné na vnášanie fluorofórov do molekúl AA, ktoré vedú k ich extrémne citlivej detekcii. Fluorescamín eliminuje nedostatok drivej väčšiny derivatizačných postupov, ktorým sú nároky na relatívne veľké množstvo derivatizovanej vzorky. Iné z derivatizačných činidiel, DTNB, má potenciálne významné aplikačné možnosti v selektívnej detekcii tio-AA, zatiaľ čo reakcia AA s Dns-Cl je v súčasnosti pravdepodobne jedinou bežnou derivatizačnou reakciou, ktorá umožňuje spoľahlivú detekciu a stanovenie cystínu. Dinitrofenyl deriváty majú veľmi dobré elektroforetické vlastnosti a syntéza umožňuje prípravu analyticky dobre definovaných produktov. Rádioaktívne značenie v spojení s použitím pyridoxalu umožňuje vysoko citlivú a extrémne selektívnu rádio-metrickú detekciu AA. Z uvedeného je zreteľná potreba používania väčšieho počtu derivatizačných činidiel a postupov v CE aminokyselín, ale aj výzva na vývoj funkčne cielených činidiel.

Táto práca bola finančne podporená Slovenskou grantovou agentúrou pre vedu (projekt No. 1/4138/97).

Zoznam použitých skratiek pre derivatizačné činidlá

AEOD-Cl	2-(9-antryl)etyl chloroformát
AITC	alylizotiokeanát
AKC	anhydrid kyseliny citrakónovej
APOC-Cl	(+)/(–)-1-(9-antryl)-2-propyl chloroformát
AQC	6-aminochinoly- <i>N</i> -hydroxysukcinimidoyl karbamát
ARC-Cl	akridón- <i>N</i> -acetyl chlorid
BANS-Cl	5-di- <i>n</i> -butylaminonaftalén-1-sulfonyl chlorid
BEITC	but-3-enyl izotiokeanát
BITC	benzyl izotiokeanát
CBQCA	3-(4-karboxybenzoyl)-2-chinolín-karboxaldehyd
CDITC	(1 <i>S</i> /1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> /2 <i>R</i>)- <i>N</i> -[(2-izotiokeanato)cyklohexyl]-6-metoxi-4-chinolinylamid
CFSE	5-karboxyfluoresceín sukcinimidyl ester
CRA-Cl	karbazol-9-yl-acetyl chlorid
CRP-Cl	karbazol-9-yl-propionyl chlorid
DABITC	dimetylaminoazobenzén izotiokeanát
DAT	(+)- <i>O</i> , <i>O</i> '-diacetyl-anhydrid kyseliny L-vínnej
DBD-NCS	7-[(<i>N,N</i> -dimetylamino)sulfonyl]-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl izotiokeanát
Dbs-Cl	4-dimetylaminoazobenzén-4-sulfonyl chlorid
DBT	(+)- <i>O</i> , <i>O</i> '-dibenzoyl-anhydrid kyseliny L-vínnej
DCCS	sukcinimidyl ester 7-(dietylamino)kumarín-3-karboxylová kyselina
DNB-Cl	3,5-dinitrobenzoyl chlorid
DNFB	2,4-dinitrofluórbenzén

DNFB-L-Ala	1-fluoro-2,4-dinitrofenyl-5-L-alanín
Dns-Cl	5-dimetylamino-naftalén-1-sulfonyl chlorid
DTNB	5,5'-ditiobis[2-nitrobenzoová kyselina]
FDNDEA	<i>N,N</i> -dietyl-2,4-dinitro-5-fluoroanilín
FITC	fluoresceín izotiokeanát
FLEC-Cl	(+)/(–)-1-(9-fluorenyl)etyl chloroformát
FMOC-Cl	9-fluorenylmetyl chloroformát
GITC	2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-β-D-glukopyranozyl izotiokeanát
HLTE	<i>gamma</i> -laktón tetrahydropyranil éter
IDA	1-metoxycarbonylindolizín-3,5-dikarboxaldehyd
ILITC	izoluminol izotiokeanát
MDF	2-metoxi-2,4-difenyl-3-(2 <i>H</i>)-furanón
NAS	<i>N</i> -acetoxysukcinimid
NBD-F	7-fluoro-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazol
NBD-PyNCS	<i>R</i> -(–)/ <i>S</i> -(+)-4-(3-izotiokeanatopyrolidin-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	naftalén-2,3-dikarboxaldehyd
NPITC	4-nitrofenyl izotiokeanát
OPA	dialdehyd kyseliny <i>o</i> -ftalovej
PAPITC	<i>p</i> -fenylazofenyl izotiokeanát
PDITC	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)- <i>N</i> -[(2-izotiokeanato)-cyklohexyl]-pi-valinoyl]amid
PEITC	fenyletyl izotiokeanát
PITC	fenyl izotiokeanát
PQQ	redoxný koenzým pyrolochinolín chinón
SAMBI	(<i>S</i>)-1-fenyletylizotiokeanát
SEDC	sukcinimidyl ester dikarbocyanín
SEP	sukcinimidyl ester pyronín
SET	sukcinimidyl ester tiazín
SETC	sukcinimidyl ester trikarbocyanín
SINC	sukcinimido α-naftylkarbamát
SNEIT	(<i>S</i>)-1-(1-naftyl)etyl izotiokeanát
TCITC	trikarbocyanín izotiokeanát
TNBS	2,4,6-trinitrobenzénsulfónová kyselina
TRITC	tetrametylrodamin izotiokeanát

LITERATÚRA

- Hunt S., v knihe: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids* (Barrett G. C., ed.), str. 376. Chapman and Hall, London 1985.
- Armstrong D. W., Rundlett K. L., Chen J. R.: *Chirality* 6, 496 (1994).
- Armstrong D. W., Gasper M. P., Rundlett K. L.: *J. Chromatogr. A* 689, 285 (1995).
- Bardelmeijer H. A., Lingeman H., deRuiter C., Underberg W. J. M.: *J. Chromatogr. A* 807, 3 (1998).
- Bardelmeijer H. A., Waterval J. C. M., Lingeman H., Vanthof R., Bult A., Underberg W. J. M.: *Electrophoresis* 18, 2214 (1997).
- Krull I. S., Strong R., Sosic Z., Cho B. Y., Beale S. C., Wang C. C., Cohen S.: *J. Chromatogr. B* 699, 173 (1997).
- Smith J. T.: *Electrophoresis* 18, 2377 (1997).
- Oguri S., Yokoi K., Motohase Y.: *J. Chromatogr. A* 787, 253 (1997).
- Taga A., Sugimura M., Honda S.: *J. Chromatogr. A* 802, 243 (1998).
- Thompson J. E., Vickroy T. W., Kennedy R. T.: *Anal. Chem.* 71, 2379 (1999).

11. Tivesten A., Folestad S.: *Electrophoresis* 18, 970 (1997).
12. Hernandez L., Escalona J., Verdeguer P., Guzman N. A.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 2149 (1993).
13. Coque M. C. G. A., Hernández M. J. M., Camanas R. M. V., Fernández C. M.: *Anal. Biochem.* 178, 1 (1989).
14. Oguri S., Fujiyoshi T., Miki Y.: *Analyst* 121, 1683 (1996).
15. Molnarperl I., Vasanits A.: *J. Chromatogr. A* 835, 73 (1999).
16. Tivesten A., Lundqvist A., Folestad S.: *Chromatographia* 44, 623 (1997).
17. de Montigny P., Stobaugh J. F., Givens R. S., Carlson R. G., Srinivasachar K., Sternson L. A., Higuchi T.: *Anal. Chem.* 59, 1096 (1987).
18. Robert F., Bert L., Parrot S., Denoroy L., Stoppini L., Renaud B.: *J. Chromatogr. A* 817, 195 (1998).
19. Swanek F. D., Anderson B. B., Ewing A. G.: *J. Microcolumn Sep.* 10, 185 (1998).
20. Liu J., Hsieh Y. Z., Wiesler D., Novotny M.: *Anal. Chem.* 63, 408 (1991).
21. Drobica L., Podhradský D., Augustin J.: *The Chemistry of Cyanates and their Thio Derivatives*, zv. 2, kapitola 22. Wiley, Chichester 1977.
22. Feng L., Mitchell M. E.: *J. Chromatogr. A* 832, 211 (1999).
23. Cheng Y. F., Dovichi N. J.: *Science* 242, 562 (1988).
24. Nishi H., Fukuyama T., Matsuo M.: *J. Microcolumn Sep.* 2, 234 (1990).
25. Bonfichi R., Dallanoce C., Lociuoro S., Spada A.: *J. Chromatogr. A* 707, 355 (1995).
26. Bjerregaard C., Moller P., Sorensen H., Sorensen J. C., Sorensen S.: *J. Chromatogr. A* 836, 115 (1999).
27. Flanagan J. H., Khan S. H., Menchen S., Soper S. A., Hammer R. P.: *Bioconjugate Chem.* 8, 751 (1997).
28. Wu S. O., Dovichi N. J.: *Talanta* 39, 173 (1992).
29. Zhao J. Y., Chen D. Y., Dovichi N. J.: *J. Chromatogr.* 608, 117 (1992).
30. Britzmckibbin P., Vo H. C., Macgillivray R. T. A., Chen D. D. Y.: *Anal. Chem.* 71, 1633 (1999).
31. Walk T. B., Sussmuth R., Kempter C., Gnau V., Jack R. W., Jung G.: *Biopolymers* 49, 329 (1999).
32. Huang Y., Matsunaga H., Toriba A., Santa T., Fukushima T., Imai K.: *Anal. Biochem.* 270, 257 (1999).
33. Skočir E., Prosek M., Strazisar M., Golob T., Plestenjak A. M.: *J. Microcolumn Sep.* 9, 451 (1997).
34. Su S. C., Yu P. C., Liu C. H., Shiau H. W., Lee S. C., Chou S. S.: *J. Food Drug Anal.* 6, 455 (1998).
35. Knapp D. H.: *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Wiley, New York 1979.
36. Martín P., Polo C., Cabezudo M. D., Dabrio M. V.: *J. Liq. Chromatogr.* 7, 539 (1984).
37. Furst P., Pollack L., Graser T. A., Godel H., Stehle P.: *J. Chromatogr.* 449, 557 (1990).
38. Banks P. R., Paquette D. M.: *Bioconjugate Chem.* 6, 447 (1995).
39. Lau S. K., Zaccardo F., Little M., Banks P.: *J. Chromatogr. A* 809, 203 (1998).
40. Mank A. J. G., Yeung E. S.: *J. Chromatogr. A* 708, 309 (1995).
41. Liu H. J., Sanuda Pena M. C., Harvey White J. D., Kalra S., Cohen S. A.: *J. Chromatogr. A* 828, 383 (1998).
42. Iwaki K., Nimura N., Hiraga Y., Kinoshita T., Takeda K., Ogura H.: *J. Chromatogr.* 407, 273 (1987).
43. Higashijima T., Fuchigami T., Imasaka T., Ishibashi N.: *Anal. Chem.* 64, 711 (1992).
44. Fuchigami T., Imasaka T., Shiga M.: *Anal. Chim. Acta* 282, 209 (1993).
45. Fan X. J., You J. M., Kang J. W., Ou Q. Y., Zhu Q. C.: *Anal. Chim. Acta* 367, 81 (1998).
46. You Y. M., Sun H. T., Lao W. J., Ou Q. Y.: *Anal. Chim. Acta* 382, 51 (1999).
47. Gahm K. H., Stalcup A. M.: *Anal. Chem.* 67, 19 (1995).
48. Bourque A. J., Krull I. S.: *J. Chromatogr.* 537, 123 (1991).
49. Schutzner W., Fanali S., Rizzi A., Kenndler E.: *J. Chromatogr.* 639, 375 (1993).
50. Lindner W., Leitner C., Uray G.: *J. Chromatogr.* 316, 605 (1984).
51. Schutzner W., Caponecchi G., Fanali S., Rizzi A., Kenndler E.: *Electrophoresis* 15, 769 (1994).
52. Melucci D., Xie M., Reschiglian P., Torsi G.: *Chromatographia* 49, 317 (1999).
53. Wan H., Andersson P. E., Engström A., Blomberg L. G.: *J. Chromatogr. A* 704, 179 (1995).
54. Malmer M. F., Schroeder L. A.: *J. Chromatogr.* 514, 227 (1990).
55. Engstrom A., Anersson P. E., Josefsson B., Pfeffer W. D.: *Anal. Chem.* 67, 3018 (1995).
56. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr.* 622, 269 (1993).
57. Godel H.: *Dizertačná práca*. Univerzita Hohenheim, Stuttgart 1986.
58. Faulkner A. J., Veening H., Becker H. D.: *Anal. Chem.* 63, 292 (1991).
59. Chan K. C., Janini G. M., Muschik G. M., Issaq H. J.: *J. Chromatogr. A* 653, 93 (1993).
60. Fermo I., Rubino F. M., Bolzacchini E., Arcelloni C., Paroni R., Bonini P. A.: *J. Chromatogr.* 433, 53 (1988).
61. Van der Horst F. A. L., Holthuis J. J. M.: *J. Chromatogr.* 426, 267 (1988).
62. Caudill W. L., Wightman R. M.: *Anal. Chim. Acta* 141, 269 (1982).
63. Sanger F.: *Biochem. J.* 39, 507 (1945).
64. Ruyters H., Vanderwal S.: *J. Liq. Chromatogr.* 17, 1883 (1994).
65. Pietrzyk D. J., Chen S., Chanthawat B.: *J. Chromatogr. A* 775, 327 (1997).
66. Wei J., Gostkowski M. L., Gordon M. J., Shear J. B.: *Anal. Chem.* 70, 3470 (1998).
67. Rose M. J., Lunte S. M., Carlson R. G., Stobaugh J. F.: *Anal. Chem.* 71, 2221 (1999).
68. Esaka Y., Yamaguchi Y., Kano K., Goto M.: *J. Chromatogr. A* 652, 225 (1993).
69. Jenke D. R., Brown D. S.: *Anal. Chem.* 59, 1509 (1987).
70. Kaniasky D., Zelenský I.: *J. Chromatogr.* 638, 225 (1993).
71. Kitae T., Nakayama T., Kano K.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1998, 207.
72. Verleysen K., Sandra P.: *J. Microcolumn Sep.* 11, 37 (1999).
73. Tesařová E., Bosáková Z., Pacáková V.: *J. Chromatogr. A* 838, 121 (1999).
74. Waldron K. C., Wu S. L., Earle C. W., Harke H. R., Dovichi N. J.: *Electrophoresis* 11, 777 (1990).

75. Cohen S. A.: *J. Chromatogr.* 512, 283 (1990).
76. Hashimoto M., Tsukagoshi K., Nakajima R., Kondo K.: *J. Chromatogr. A* 832, 191 (1999).
77. Kleidernigg O. P., Lindner W.: *Chromatographia* 44, 465 (1997).
78. Kleidernigg O. P., Lindner W.: *J. Chromatogr. A* 795, 251 (1998).
79. Liu Y. M., Schneider M., Sticha C. M., Toyooka T., Sweedler J. V.: *J. Chromatogr. A* 800, 345 (1998).
80. Seidel B. S., Faubel W.: *J. Chromatogr. A* 817, 223 (1998).
81. Holloway C. J.: *J. Chromatogr.* 390, 97 (1987).
82. Wan H., Blomberg L. G.: *Electrophoresis* 17, 1938 (1996).
83. Thorsen G., Engstrom A., Josefsson B.: *J. Chromatogr. A* 786, 347 (1997).
84. Tran A. D., Blanc T., Leopold E. J.: *J. Chromatogr.* 516, 241 (1990).

P. Mikuš and D. Kaniánsky (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Derivatization Reactions in Capillary Electrophoresis of Amino Acids**

The article deals with derivatization reactions employed in capillary electrophoresis (CE) of amino acids (AA). Cur-

rently preferred reactions are classified into seven groups according to their reaction mechanisms and schemes. Many of them were originally developed for liquid chromatography of AA and their implementation in CE usually requires minor modifications of the working conditions depending on specificities of the process. So far, more than fifty derivatization reactions of AA have been reported in the literature in the context of CE. This apparently reflects not only different reactivities of AA with different derivatization agents but also different envisaged applications of CE. Therefore, in some instances, requirements for high reaction rates determine the choice (e.g., post-column derivatizations of AA, *in vivo* monitoring of AA in microdialysates from biological processes). On the other hand, a need for the detection of amol-zmol amounts of AA may be often better met by the reactions characterized by lower reaction rates. Some of the derivatization agents provide very selective detections of a specific class of AA, e.g., detection of sulfanyl amino acids based on their reactions with 2,2'-dinitro-5,5'-disulfonyl-dibenzoic acid. So far, only a limited number of the derivatization reactions is applicable in the AA sequenations of peptides and proteins by CE. Here, phenyl isothiocyanate, 7-(*N,N*-dimethylsulfamoyl)-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl isothiocyanate and 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene appear to have a prominent position.