

## ► AMINOSÄUREANALYTIK

### OPA oder Ninhydrin? – Klassiker im Vergleich (von Markus Fuchs)

#### Die klassischen Vorsäulen- und Nachsäulenderivatisierungen im Vergleich.

Die quantitative Aminosäureanalytik findet Anwendung in der Protein-Sequenzanalytik und – für freie Aminosäuren – in der Produktüberwachung aminosäurehaltiger Lösungen bei Arznei- und Lebensmitteln und in der medizinischen Forschung und Diagnostik.

Während im Arznei- und Lebensmittelbereich die Ninhydrin-Nachsäulenderivatisierungs- (postcolumn-) Methode mit der hier gezeigten Methode sehr gut reproduzierbare Werte liefert, hat sich im medizinischen Bereich zunehmend die o-Phthaldialdehyd-

Eluat mittels einer Nachsäulenpumpe (K-500) mit Ninhydrin im frei zugänglichen Reaktionscoil im Reaktor (einem Hochleistungs-Säulenofen bei 110 °C) gemischt und die Derivate im Detektor K-2500 vermessen.

Es entsteht ein Aminosäuren-postcolumn-Chromatogramm, wie es Abbildung 1 zeigt (Aminosäuren-Standard-Lösung). Die Analysezeit konnte mit 80 Minuten inklusive Regenerierung des Austauscher-Harzes und Reäquilibration durch Verwendung eines optimierten Puffersystems kurz gehalten werden. Der Stufengradient wird mittels eines Vorschaltventils mit elektrischem Ventiltrieb gesteuert. Somit ist ein Ausbau bis 6 Puffer (K-6), mittels

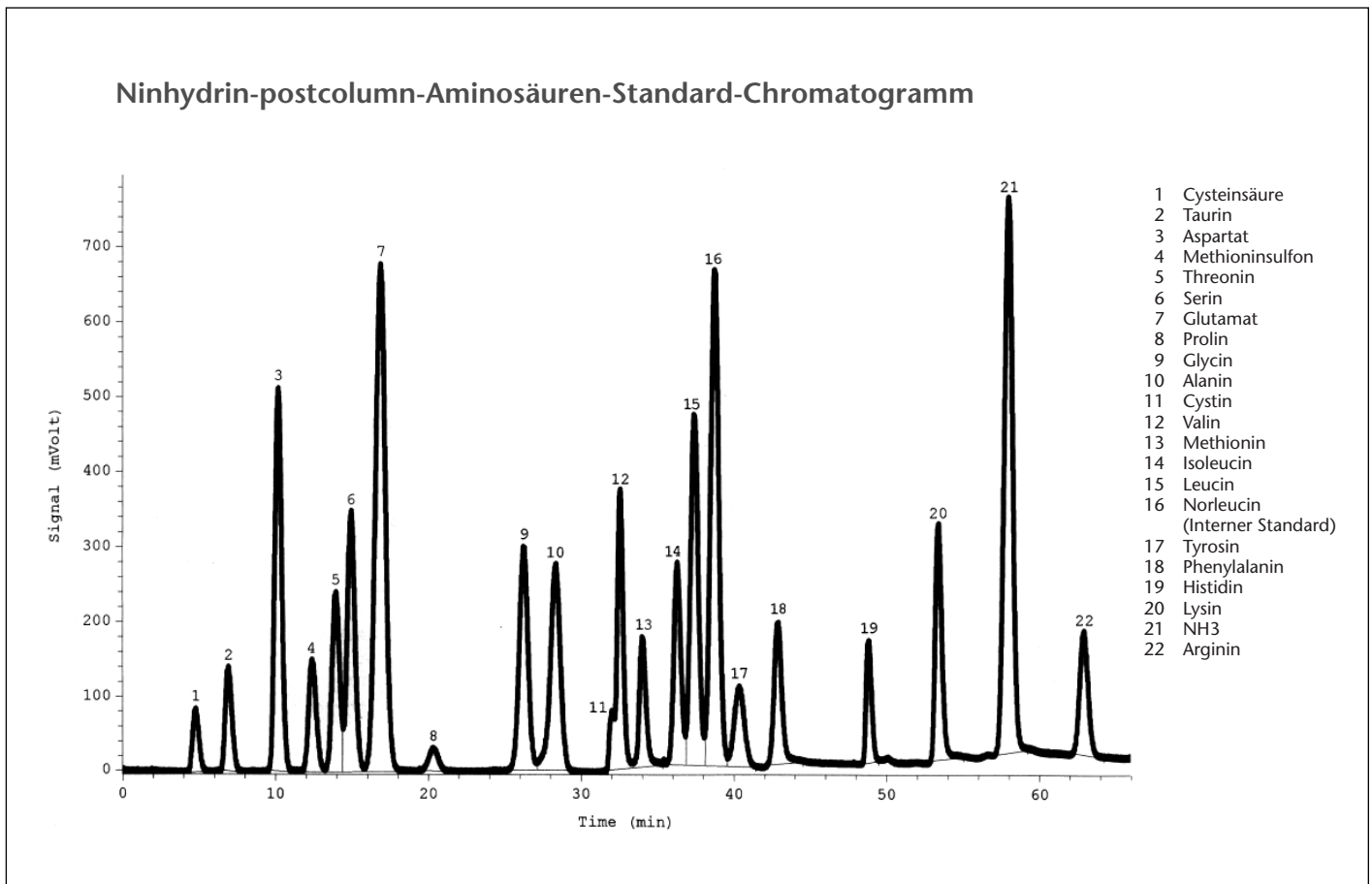


Abbildung 1: Bestimmung einer Standardlösung mit 100 µmol/L je Aminosäure im Ninhydrin-Postcolumn-Aminosäureanalysator

Vorsäulenderivatisierungs- (precolumn-) Methode durchgesetzt. Beide Methoden sind heute auf vollautomatischen, modularen HPLC-Systemen durchführbar.

Die Ninhydrin-postcolumn-Methode besitzt instrumentell den Vorteil, daß die Injektion mit Hilfe eines Standard-Autosamplers durchgeführt werden kann. In unserem Beispiel ist auch die Nachsäulenderivatisierungseinheit modular, d. h. aus HPLC-Standardbausteinen, aufgebaut: Nach Trennung der Aminosäuren in einer Ionenaustauschersäule im Stufengradienten wird das

Zusatzventilen auch 8 Puffer oder mehr, möglich. Die Wellenlängen-Schaltung des K-2500-Detektors erlaubt die empfindliche Quantifizierung von Prolin bei 440 nm anstelle von 570 nm. Hierzu wird ein im Chromatogramm kaum sichtbarer Wellenlängenwechsel mit Autozero ausgeführt.

Die Vorsäulenderivatisierung mit dem Fluoreszenzmarker OPA wird auf einem Derivatisierungs-Autosampler Triathlon ausgeführt. Bis zu 4 Reagenzien-Positionen erlauben eine flexible Anpassung der Methode an unterschiedliche Probenmatrices (Vor-

## ► AMINOSÄUREANALYTIK

### OPA oder Ninhydrin? – Klassiker im Vergleich (Fortsetzung)

verdünnung u. a.). Die Derivate werden im Methanol-/Acetatpuffer-Gradienten an einer OPA-Umkehrphasensäule getrennt und im Fluoreszenzdetektor bei  $\lambda_{EX} = 330 \text{ nm}$  und  $\lambda_{EM} = 450 \text{ nm}$  vermessen. Ein Beispiel für eine Trennung von Aminosäuren nach der precolumn-OPA-Methode zeigt Abbildung 2. Als Probenvor-

bereitung für die Aminosäureanalytik wird die Gefriertrocknung empfohlen. Steuerung und Datenaufnahme sowie Datenweiterverarbeitung übernimmt für beide Anordnungen das HPLC-Datensystem Eurochrom® 2000 für Windows.

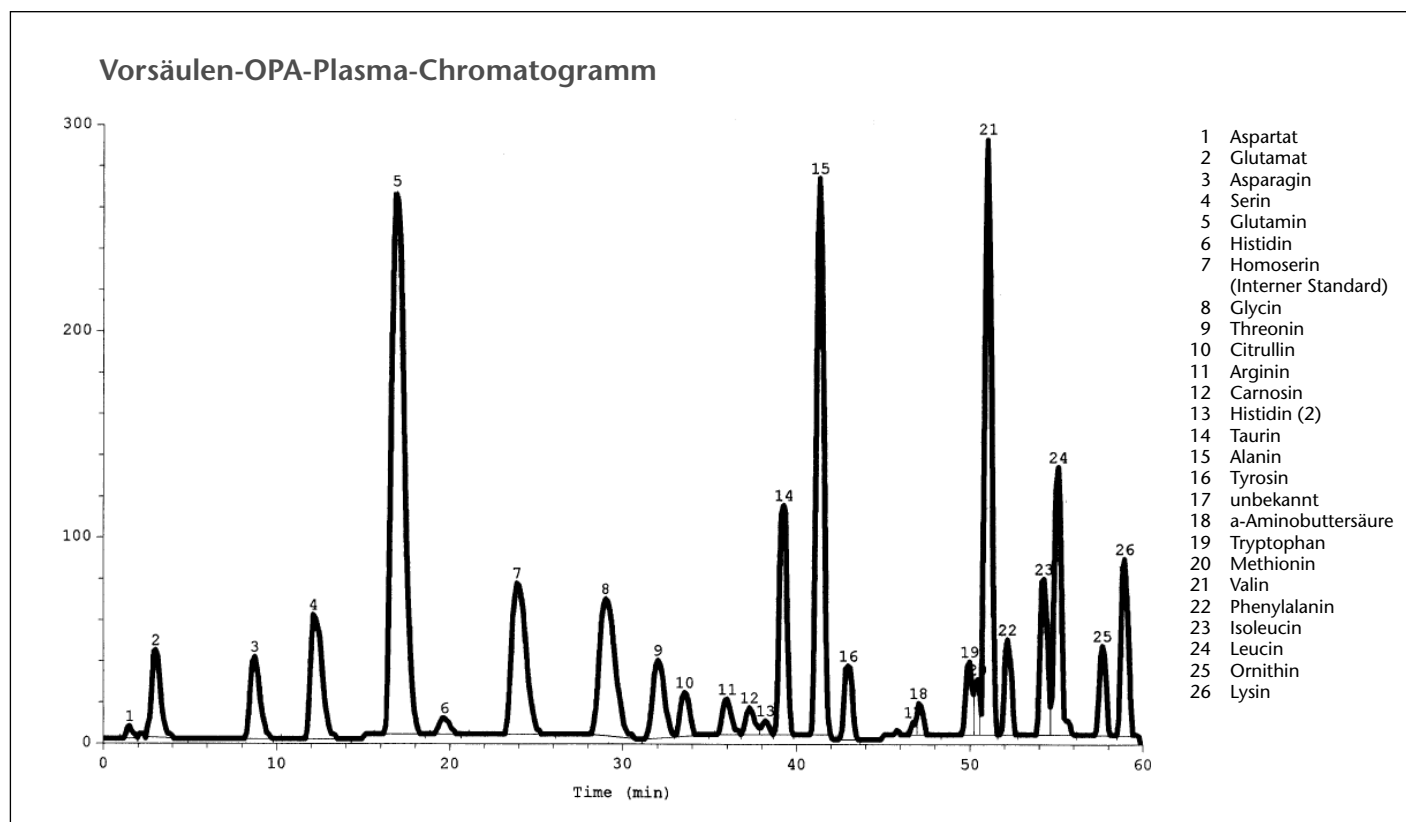


Abbildung 2: Bestimmung von OPA-Aminosäuren aus humanem Blutplasma im Precolumn-OPA-Aminosäureanalysator

#### Gerätezusammenstellung

##### Postcolumn-Ninhydrin-Amino Acid Analyzer

Best.-Nr. Artikel

A3045	Package Amino Acid Analyzer Ninhydrin bestehend aus:
893091	Flaschenset mit Belüftungsventilen
A4030	WellChrom MaxiStar K-1001 HPLC-Pumpe
A4001	analytischer Pumpenkopf Edelstahl
A1375	Solvent Distributor Ventil 1/8" Edelstahl
A0377	elektrischer Ventiltrieb K-6
A0585	Säulenofen mit Temp.-Programmer 5–85 °C
A0320	Autosampler Marathon
A0652	Reaktionsofen
A4040	Reaktorpumpe
A4002	Pumpenkopf PEEK für Reaktorpumpe
A4080	Spektralphotometer mit Wellenlängenprogrammierung
A4061	analytische Meßzelle für Spektralphotometer
A1394	Softwarepaket Eurochrom 2000 für Windows mit Computer/Drucker
A0664	Start up kit Autosampler
A1039	HPLC start up kit biokompatibel

Best.-Nr. Artikel

B893091 Ionenaustauscher-Fertigsäule mit NH<sub>3</sub>-Filtersäule und Eluenten-/Reagenziensatz

#### Gerätezusammenstellung

##### OPA-precolumn Amino Acid Analyzer

Best.-Nr. Artikel

A0426	Package Amino Acid Analyzer OPA bestehend aus:
A2015	4-Kanal-Degasser
A4030	WellChrom MaxiStar K-1001 mit Solvent Organizer K-1500 Gradient
A4001	analytischer Pumpenkopf Edelstahl
A0285	dynamische Mischkammer
A0320	Autosampler Triathlon
A0821	Fluoreszenz-Detektor
A1394	Softwarepaket Eurochrom® 2000 für Windows mit Computer/Drucker
A0664	Start up kit Autosampler
A0910	HPLC start up kit
B161	OPA-Säule für die Vorsäulenderivattrennung