

BIOGENE AMINE



Biogene Amine (auch Polyamine genannt), im wesentlichen Histamin, Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin, sind niedermolekulare organische Basen, die im normalen Stoffwechsel von Mensch, Tier, Pflanze und Mikroorganismus gebildet und metabolisiert werden. Sie besitzen bei der Aufnahme hoher Mengen eine schädigende Wirkung auf den Organismus. Ihre Anwesenheit in Lebensmitteln weist auf unerwünschte mikrobielle Aktivität hin und kann deshalb auch als Indikator für den Grad der mikrobiologischen Belastung herangezogen werden.

Um biogene Amine im Spurenbereich nachweisen zu können, wird von PICKERING eine komplette Methode (PINNACLE PCX-System und Applikations-Kit) für Lebensmittel und Getränke angeboten. Das Kit für biogene Amine enthält neben der Säule auch Reagenzien, Diluenten und Eluenten.

Methodenbeschreibung

Die Trennung der biogenen Amine erfolgt auf einer speziellen Kalium-Ionenaustauschersäule, die aufgrund ihrer hohen Selektivität und Robustheit die Probenvorbereitung stark vereinfacht.

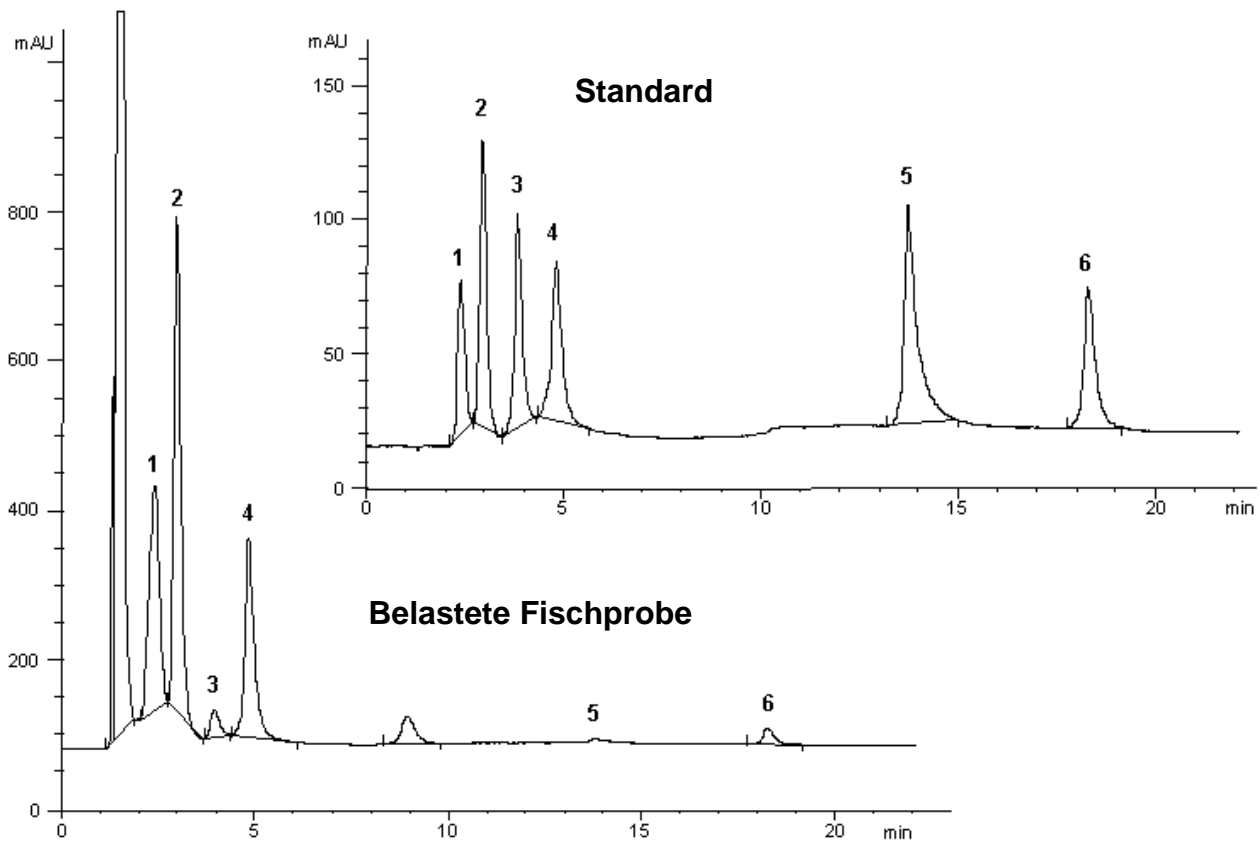
Die Derivatisierung der biogenen Amine erfolgt in einer einstufigen Reaktion mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiofluor[®] (2-Mercaptoethanolderivat) zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat.

In der Literatur finden sich auch Vorschriften zur Analytik biogener Amine mit Nachsäulenderivatisierung, die andere Säulentypen und Laufmittel vorsehen. Selbstverständlich kann das PINNACLE PCX auch in Verbindung mit diesen Vorschriften verwendet werden.

Chromatogramme

Chromatogramm eines Standards und einer belasteten Probe (BAI = 17)

Signal	Verbindung	Standard [ng abs.]	Probe [ng abs.]
1	Tyramin	100	240
2	Histamin	100	220
3	Putrescin	200	70
4	Cadaverin	200	430
5	Spermin	100	< 10
6	Spermidin	200	30



HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

HPLC	
Betriebsmodus	Tertiärer Gradient
Eluent	K600-Eluent und K563-Eluent (Kaliumhydrogenphosphatpuffer / iso-Propanol) K130-Regenerant (wässrige Kaliumhydroxidlösung / iso-Propanol)
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	ALKION®, Ionenaustauschersäule, K ⁺ -Form, 4x 150mm
Flussrate	0.8 mL/min
Injektionsvolumen	Bis 100 µL
Nachsäulenderivatisierung	
Pinnacle PCX	Einstufig; 150 µL Reaktor
Säulenofen	40 °C
Reaktorvolumen	0,15 mL
Reaktortemperatur	45 °C
Reagenz	Lösung von o-Phthaldialdehyd (OPA) und Thiofluor® (2-Mercaptoethanolderivat) in OD104-Diluent (Natriumboratpuffer, pH-Wert 10,4). Konzentration: 100 mg OPA und 2 g Thiofluor in 1L Diluent.
Reagenzfluss	0.3 mL/min
Detektion	
Messart	Fluoreszenz-Detektion
Anregungswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis mindestens 7 bar

Achtung: Extremer pH-Bereich!

Wegen des alkalischen Regeneranten (pH 13) dürfen keine Teile aus Vespel im HPLC-System vorhanden sein, sondern müssen gegen Teile aus pH-inertem Material (Tefzel oder PEEK) ausgetauscht werden. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate.

Eine inerte Ausführung (Titan, PEEK) der HPLC-Anlage ist nicht notwendig, eine Kolbenhinterspülung der Pumpenköpfe aber empfehlenswert.

Um Korrosion der Anlage und Kontamination der Ionenaustauschersäule mit Metallionen zu vermeiden, empfiehlt es sich vor allem ältere HPLC-Systeme zu passivieren. Kontaktieren Sie dazu Ihren LC-Außendienst oder ziehen Sie Ihr Handbuch zu Rate.

Autosampler

Zum Erzielen reproduzierbarer Retentionszeiten bei der Analytik biogener Amine mit Ionenaustauschersäulen ist es wichtig, den zeitlichen Abstand zwischen den Injektionen genau einzuhalten. Steht nur ein manueller Injektor zu Verfügung, sollte die Kontrolle der Injektionszeiten mit einem Laborwecker erfolgen.

Hinweis: Die Verwendung einer RP-Säule und/oder anderer Laufmittel hat keinen Einfluss auf die Konfiguration des Pickering Systems!

Gradientenprogramm

METHODE: ALKION®-Ionenaustauschersäule für biogene Amine
 Flussrate: 0,8 mL/min; Säulentemperatur: 40°C

Schritt	Zeit [min]	Intervall [min]	K600 [%]	K563 [%]	K130 [%]	
0	0	0	100	0	0	Injektion
1	6	6	100	0	0	Isokratisch
2	15	9	0	100	0	Linearer Gradient
3	21	6	0	100	0	Isokratisch
4	21 - 23	2	0	0	100	Sprung + Spülen
5	23	5 - 9	100	0	0	Re-Equilibrierung

Literatur

- 1) M. J. Walters., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (6), 1040 – 1043.
- 2) M. L. Tracy, M. V. Pickering, T. VerHulst, *Food Testing and Analysis* 1995, 1 (3), 48-50.
- 3) M. L. Izquierdo-Pulido, M. C. Vidal-Carou, A. Marine-Font, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1993, 1027 – 1032.
- 4) L. Simon-Sarkadi, W. H. Holzapfel, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994, 230 – 233.

Chemikalien und Säulen

Nachsäulenderivatisierungs-System

Bestellnummer	Beschreibung
1153-1012	PINNACLE PCX; einstufig, 150 µL Reaktor

Applikationen-Kit

Bestellnummer	Beschreibung
0352-0040	Applikationenkit „Biogene Amine“ mit Gradientenelution, bestehend aus:
9410917	ALKION®, Ionenaustauschersäule, K ⁺ -Form, 4 x 150 mm
9493020	Vorsäule, K ⁺ -Form, 3 x 20 mm
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), „Chromatographic Grade™“, 5 g
OD104	OPA-Diluent, „Chromatographic Grade™“, 4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor®, „Chromatographic Grade™“, 10 g
K600	Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 4 x 950 mL
K563	Kaliumphosphatpuffer, pH 5,63, 4 x 950 mL
K130	Säulenregenerant, 950 mL

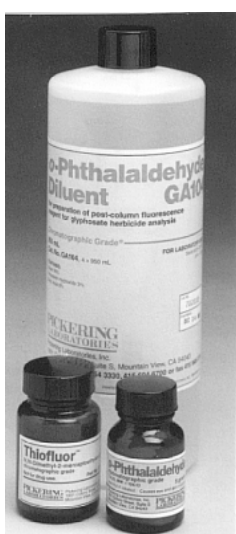
Trennsäule für die Analytik von biogenen Aminen

Um eine gleich bleibende Trennleistung der PICKERING-Säulen für die Analytik von biogenen Aminen zu gewährleisten, wird jede einzelne mit Kalibrierstandards unter den spezifischen Elutionsbedingungen getestet. Die getesteten Säulen werden mit Seriennummer versehen und zusammen mit dem Testchromatogramm verschickt.

Kationenaustauschersäulen finden hauptsächlich bei der Trennung von Aminen in komplexen Matrices mit anschließender Nachsäulenderivatisierung Verwendung. Im Gegenteil zu Reversed-Phasen, bei denen alle gelösten Substanzen gleichzeitig um die Wechselwirkung mit der stationären Phase konkurrieren, ist der Retentionsmechanismus bei Ionenaustauschersäulen sehr selektiv und matrixunabhängig. Da Sulfonsäuregruppen des Divinylbenzol-Polymers eine hohe Ionenaustauscherkapazität besitzen, werden deshalb die im sauren Milieu positiv geladenen Amine in einem engen Band auf der Säule fokussiert, während der Rest der Probenmatrix fast ungehindert weiterwandert.

Veränderungen der Retentionszeiten und der Selektivität der Säule durch Matrixeffekte werden so vermieden.

Die PICKERING-Säule ist eine Kationenaustauschersäule (K⁺-Form), die speziell für die Analytik von biogenen Aminen entwickelt wurde. Die angebotene Vorsäule ist mit dem gleichen Ionenaustauschermaterial gefüllt und wird unter denselben Bedingungen wie die analytische Säule getestet.



Bestellnummer	Beschreibung
9410917	ALKION [®] , Ionenaustauschersäule, K ⁺ -Form, 4 x 150 mm
9493020	Vorsäule, K ⁺ -Form, 3 x 20 mm

o-Phthalaldehyd Reagenz

Primäre Amine bilden mit o-Phthalaldehyd (OPA) und einem Thioalkohol (Mercaptan) im alkalischen Milieu stark fluoreszierende Isoindol-Derivate. Bei Raumtemperatur ist diese Reaktion bei einem pH-Wert von 9-10 normalerweise innerhalb von ca. 30 sec abgeschlossen.

Um eine maximale Empfindlichkeit der Methode zu gewährleisten, ist es notwendig, hochreine Chemikalien zu verwenden und die sauerstoffempfindliche OPA-Reagenzlösung ständig unter Inertgasatmosphäre zu halten. Es ist daher aber auch wichtig, nicht nur das Reagenzreservoir unter Inertgas zu halten, sondern auch luftundurchlässige Gas- und Reagenzleitungen aus Saran[®] oder PEEK zu verwenden.

Die so aufbewahrte Reagenzlösung kann bis zu 10 Tagen verwendet werden, ohne Änderung des Signal/Rauschverhältnisses.

Für die o-Phthalaldehyd-Reagenzlösung bietet PICKERING an:

- 1) Hochreines, kristallines OPA
- 2) Boratdiluent; garantiert frei von Aminen und Schwermetallen
- 3) Thiofluor; ein kristallines 2-Mercaptoethanolderivat

o-Phthalaldehyd

Bestellnummer	Beschreibung
O120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade TM ", 5 g

o-Phthalaldehyd Diluent

Für die Analytik der biogenen Amine bietet Pickering einen Natriumboratpuffer mit pH 10,4 an, der auch stark saure Eluenten abpuffert.

Bestellnummer	Beschreibung
OD104	OPA-Diluent, "Chromatographic Grade TM ", 4 x 950 mL

Thiofluor[®]

Thiofluor[®] der Firma PICKERING ist ein kristallines, schwer flüchtiges Nukleophil. Seine mit OPA und primären Aminen gebildeten Isoindol-Derivate sind bei gleichen Fluoreszenzeigenschaften stabiler als die des üblicherweise verwendeten 2-Mercaptoethanols.

Bestellnummer	Beschreibung
3700-2000	Thiofluor [®] , "Chromatographic Grade TM ", 10 g

Kaliumphosphatpuffer

- 1) Eluenten für die Elution von biogenen Aminen
- 2) Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- 3) Vorfiltriert, gebrauchsfertig
- 4) Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Diese Puffer werden für die Elution von biogenen Aminen gemäß den Methoden von PICKERING verwendet.

Bestellnummer	Beschreibung
K600	Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0, 4 x 950 mL
K563	Kaliumphosphatpuffer, pH 5,63, 4 x 950 mL

Säulenregenerant für die Analytik von biogenen Aminen

- 1) Entfernt stark gebundene Matrixbestandteile von der Säule
- 2) Garantiert frei von fluoreszierenden Verunreinigungen
- 3) Vorfiltriert, gebrauchsfertig
- 4) Gleichbleibende Qualität, Flasche für Flasche

Um stark adsorbierte Matrixbestandteile zu entfernen, ist eine Regeneration der Säule nach jedem Lauf empfehlenswert. So werden die Trennleistung der Säule und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf lange Zeit erhalten.

Bestellnummer	Beschreibung
K130	Säulenregenerant, 950 mL