

## AMINOSÄUREN



Die Methode der Analytik von Aminosäuren mittels Ionenaustauschersäule und Nachsäulenderivatisierung ist bereits 1948 veröffentlicht worden. Die Autoren Moore und Stein erhielten später dafür sogar den Nobelpreis. 60 Jahre später dauert die Analyse einer physiologischen Probe zwar keine zwei Tage mehr und die Auflösung der Säulen ist wesentlich besser, aber das Prinzip ist nach wie vor dasselbe.

Ein Grund dafür ist die außergewöhnliche Unempfindlichkeit des Retentionsmechanismus der Ionenaustauschersäule gegen Matrixeffekte, was zu einer hohen Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten sowie der Quantifizierung führt.

Für die Aminosäureanalytik bietet Pickering neben dem **PINNACLE PCX** komplette Aminosäure-Kits an, die Eluenten, Reagenzien, Diluenten, Säulen und Standards enthalten.

Bei den Kits werden zwei Typen unterschieden. Es gibt „**Natrium**“-Kits mit Natriumcitratpuffern und einer Natriumionenaustauschersäule die Analytik von Hydrolysaten von Peptiden, Proteinen, Kollagenen und Lebens- und Futtermittel.

Die andere Gruppe sind **Lithium-Kits** mit Lithiumcitratpuffern und einer Ionenaustauschersäule in der Lithiumform für die Aminosäureanalytik nativer Proben. Das sind z.B. physiologische Flüssigkeiten (Blut, Urin,...) und Zellgewebe, aber auch Lebensmittel und Getränke.

Die Derivatisierung kann auf zwei Arten erfolgen: entweder mit **TRIONE**<sup>®</sup> (Ninhydrin) oder mit **o-Phthaldialdehyd** (OPA) und **Thiofluor**<sup>®</sup> (2-Mercaptoethanolderivat).

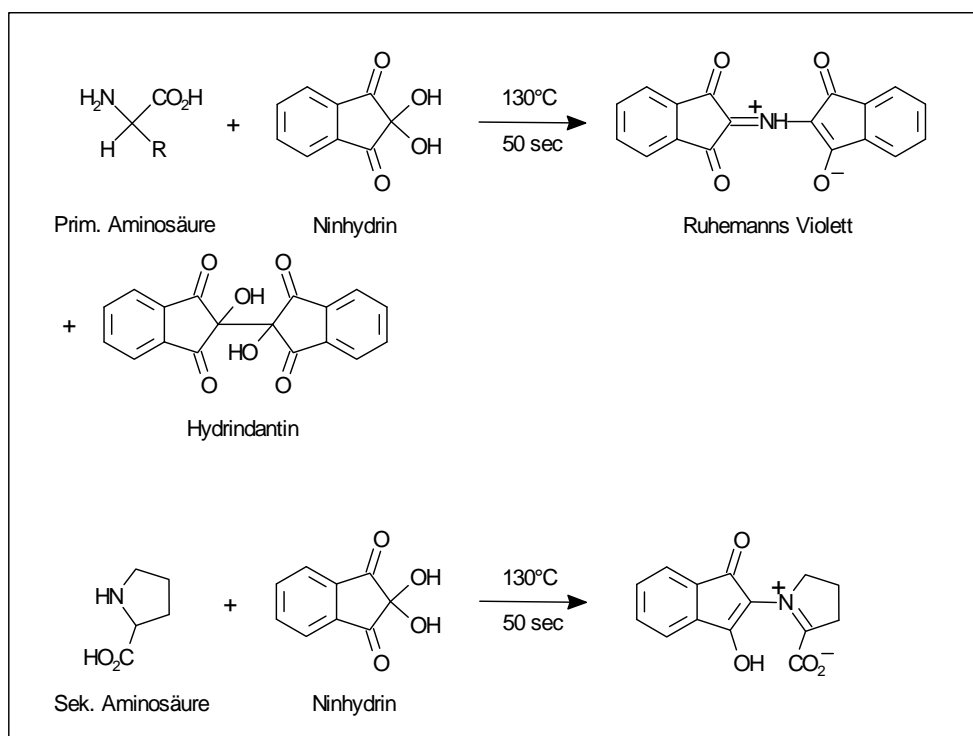
## Derivatisierung von primären und sekundären Aminosäuren mit Ninhydrin (TRIONE®)

Das gebräuchlichste Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung von Aminosäuren ist Ninhydrin. Ninhydrin bildet mit einem primären Amin eine farbige Verbindung (Ruhemanns Violett;  $\lambda_{\max} = 570 \text{ nm}$ ;  $\epsilon = 20000$ ). Als Katalysator der Reaktion dient Hydrindantin, das durch reduktive Kupplung aus zwei Molekülen Ninhydrin entsteht.

Mit einem sekundären Amin reagiert Ninhydrin auch ohne Anwesenheit von Hydrindantin zu einer gelben Verbindung ( $\lambda_{\max} = 440 \text{ nm}$ ).

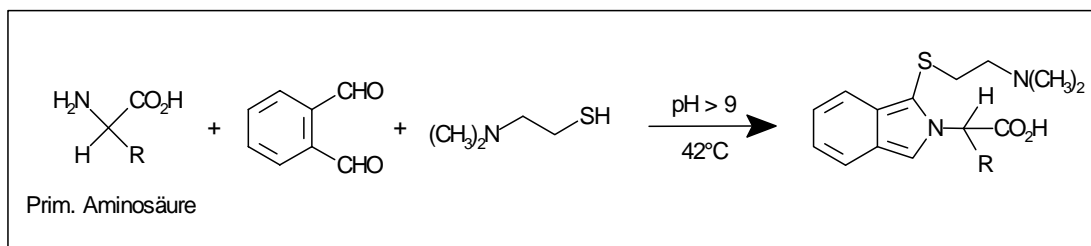
Die Nachweisgrenze (570 nm) für primäre Aminosäuren liegt bei etwa 30 pmol.

Steht nur ein 1-Kanal-UV/VIS-Detektor zur Verfügung, können beide Derivate mit etwas geringerer Empfindlichkeit auch bei 500 nm detektiert werden.



## Derivatisierung von primären Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd/Thiofluor®

Primäre Amine können mit o-Phthalaldehyd (OPA) und Thiofluor (2-Mercaptoethanolderivat) im alkalischen Milieu (pH 9-10) zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat umgesetzt werden. Die Nachweisgrenze von mit OPA derivatisierten Aminosäuren liegt bei ca. 5 pmol.



## HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter

### Derivatisierung mit Ninhydrin (TRIONE®)

<b>HPLC</b>	
Betriebsmodus	quarternärer Gradient
Eluent	Lithium- oder Natrium-Puffer
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	Lithium- oder Natrium-Ionenauschersäulen mit Vorsäule
Flussrate	0.3 - 0,6 mL/min (abhängig von der Methode)
Injektionsvolumen	Bis 100 µL
<b>Nachsäulenderivatisierung</b>	
Pinnacle PCX	Einstufig
Säulenofen	34 – 70 °C (Gradient abh. von der Methode)
Reaktorvolumen	500 µL
Reaktortemperatur	130 °C
Reagenz	TRIONE® (Ninhydrin/Hydrindantin)
Reagenzfluss	0,3 – 0.55 mL/min (abhängig von der Methode)
<b>Detektion</b>	
Messart	UV/VIS-Detektor
UV/VIS	570 nm; primäre Aminosäuren
UV/VIS	440 nm; sekundäre Aminosäuren
Zelle	Analytisch; druckstabil bis 7 bar

## Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd/Thiofluor®

<b>HPLC</b>	
Betriebsmodus	quarternärer Gradient
Eluent	Lithium- oder Natrium-Puffer
Entgasung	Helium- oder Vakuum-entgast
HPLC-Säule	Lithium- oder Natrium-Ionentauschersäulen mit Vorsäulen
Flussrate	0.3 - 0,6 mL/min (abhängig von der Methode)
Injektionsvolumen	Bis 100 µL
<b>Nachsäulenderivatisierung</b>	
Pinnacle PCX	Einstufig
Säulenofen	34 – 70 °C (Gradient abh. von der Methode)
Reaktorvolumen	150 µL
Reaktortemperatur	45 °C
Reagenz	o-Phthalaldehyd, Thiofluor®
Reagenzfluss	0,3 – 0,55 mL/min (abhängig von der Methode)
<b>Detektion</b>	
Messart	Fluoreszenz-Detektor
Exzitationswellenlänge	330 nm
Emissionswellenlänge	465 nm
Zelle	Analytisch; druckstabil bis 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 Metall-Ionen 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 Aminosäureanalytik 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.

## Aminosäureanalytik mit Natrium-Ionenaustauschersäulen

Für die Aminosäureanalytik von Hydrolysaten von Peptiden, Proteinen, Kollagenen und Lebens- und Futtermittel werden „**Natrium**“-Kits mit Natriumcitratpuffern und einer Ionenaustauschersäule in der Natriumform angeboten.

Folgende Kits werden für das **Pinnacle PCX System** empfohlen:

<b>Proteinhydrolysate (33 Minuten-Chromatogramm)</b>	TRIONE® T200*	<b>0352-0058</b>
	TRIONE® T100C*	<b>0352-0057</b>
	OPA*	<b>0352-0059</b>
<b>Kollagenhydrolysate (33 Minuten-Chromatogramm)</b>	TRIONE® T200	<b>0352-0062</b>
	TRIONE® T100C	<b>0352-0061</b>
	OPA	<b>0352-0063</b>
<b>Oxidierete Futtermittelhydrolysate (33 Minuten-Chromatogramm)</b>	TRIONE® T200	<b>0352-0021</b>
	TRIONE® T100C	<b>0352-0020</b>
	OPA	<b>0352-0022</b>

\* Trione T200: 12 Monate Haltbarkeit; Trione T100C: 3 Monate Haltbarkeit; OPA: o-Phthalaldehyde

## Methodenbeschreibungen

Bitte benutzen Sie die HPLC-Bedingungen und Derivatisierungsparameter wie auf Seite 3ff angegeben, falls keine anderen Parameter angegeben sind!

### Methode: Protein- und Kollagenhydrolysate

#### **Protein- und Kollagen-Hydrolysate: 33-Minuten-Chromatogramm**

„High Efficiency“ Ionenaustauschersäule (1154110T); 4.6 x 110 mm; Na<sup>+</sup> Form

Pickering-Kit 0352-0058, 0352-0057 oder 0352-0059 für Proteinhydrolysate

Pickering-Kit 0352-0062, 0352-0061 oder 0352-0063 für Kollagenhydrolysate

#### **Parameter:**

Flussrate: Eluent: 0.6 mL/min  
 Reagenz: 0.3mL/min  
 Anfangstemperatur der Säule: 46°C für Proteinhydrolysate  
 42°C für Kollagenhydrolysate

#### **HPLC Programm:**

Schritt	Zeit	Intervall	% Na315	% Na425	%Na 640	% RG011	Vermerk
Equil.			100	0		0	Equilibrierung
1	0	0	100	0	0	0	Injektion 10 µL
2	4.0	7	100	0	0	0	Isokratisch
3	15	6	0	100	0	0	Linearer Gradient
4	16	0.1	0	0	100	0	Laufmittelwechsel
5	31.0	14.9	0	0	100	0	Isokratisch
6	31.1	0.1	0	0	0	100	Laufmittelwechsel
7	33.0	1.9	0	0	0	100	Spülschritt
8	33.1	0.1	100	0		0	Re-Equilibrierung
9	40	8.9	100	0		0	Re-Equilibrierung

Laufzeit: 33 Min

Equilibrierungszeit: 7 Min

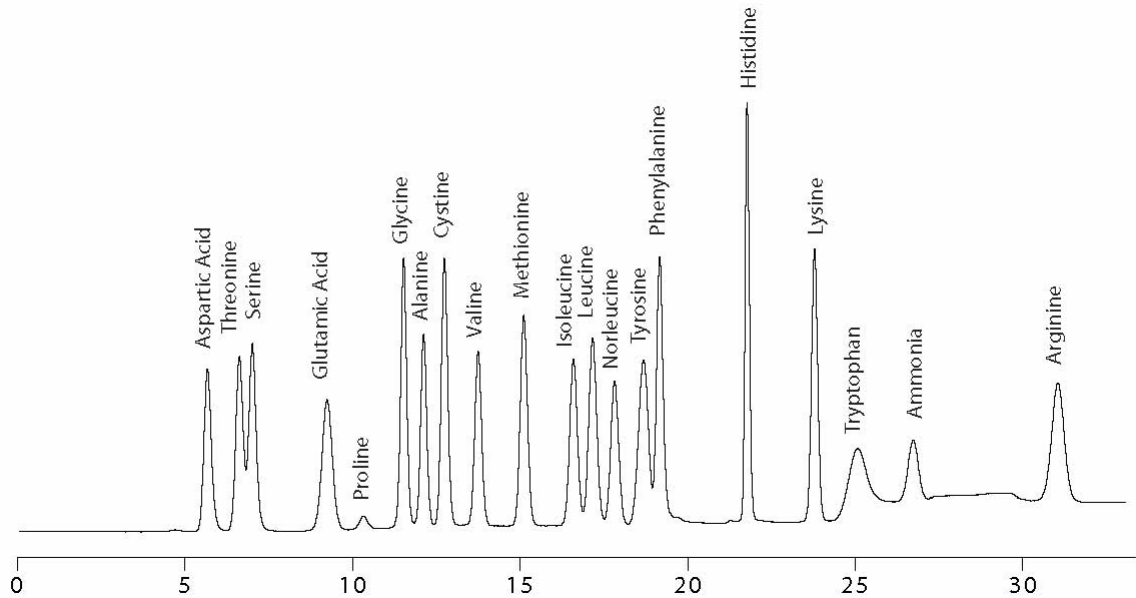
#### **Temperaturprogramm des Säulenofens für Proteinhydrolysate:**

Schritt	Zeit	Temp. °C
1	0	46
2	4	46
3	9	70
4	32	70
5	33	46

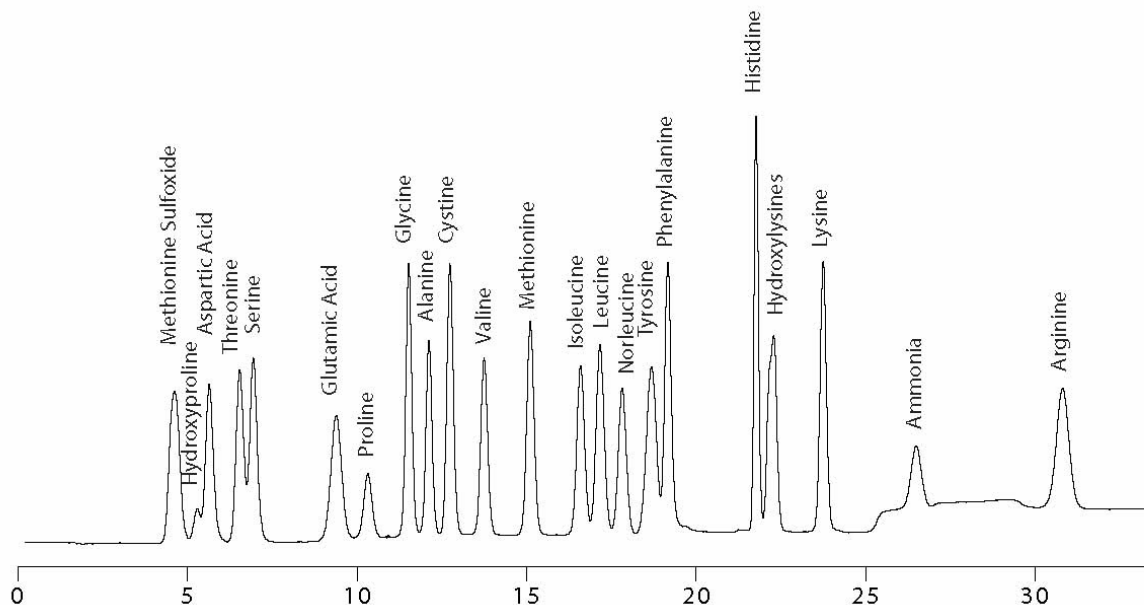
#### **Temperaturprogramm des Säulenofens für Kollagenhydrolysate:**

Schritt	Zeit	Temp. °C
1	0	42
2	4	42
3	9	70
4	32	70
5	33	42

Chromatogramm eines Aminosäurenstandard für Proteinhydrolysate  
 "High Efficiency" Ionenaustauschersäule, 4.6 x 110 mm, Na<sup>+</sup> Form  
 Probe: Proteinhydrolysat Standard, 0.25 µmol/mL (Bestell Nr.: 012506H)



Chromatogramm eines Aminosäurenstandard für Kollagenhydrolysate  
 "High Efficiency" Ionenaustauschersäule, 4.6 mm x 110mm, Na<sup>+</sup> Form  
 Probe: Collagen Hydrolysat Standard, 0.25 µmol/mL (Bestell Nr.: 012506C)



## Methode: Oxidierte Futtermittelhydrolysate

### **Oxidierte Futtermittelhydrolysate: 33-Minuten-Chromatogramm:**

„High Efficiency“ Ionenaustauschersäule (1154110T); 4.6 x 110 mm; Na<sup>+</sup> Form

Kit 0352-0020, 0352-0021 oder 0352-0022 für oxidierte Futtermittelhydrolysate

#### **Parameter:**

Flussrate: Eluent: 0.6 ml/min  
Reagenz: 0.5 ml/min  
Anfangstemperatur der Säule: 55°C

#### **HPLC-Programm:**

Schritt	Zeit	Intervall	% Na270	% Na425	% Na640	% RG011	Vermerk
Equil.			100	0	0	0	Equilibrierung
1	0	0	100	0	0	0	Injektion 10 µL
2	4.0	4	100	0	0	0	Isokratisch
3	15.0	11	0	100	0	0	Linearer Gradient
4	16.0	1	0	0	100	0	Laufmitteländerung
5	31.0	15	0	0	100	0	Isokratisch
6	31.1	0.1	0	0	0	100	Laufmitteländerung
7	33.0	1.9	0	0	0	100	Entleerung
8	33.1	0.1	100	0	0	0	Re-Equilibrierung
9	40	6.9	100	0	0	0	Re-Equilibrierung

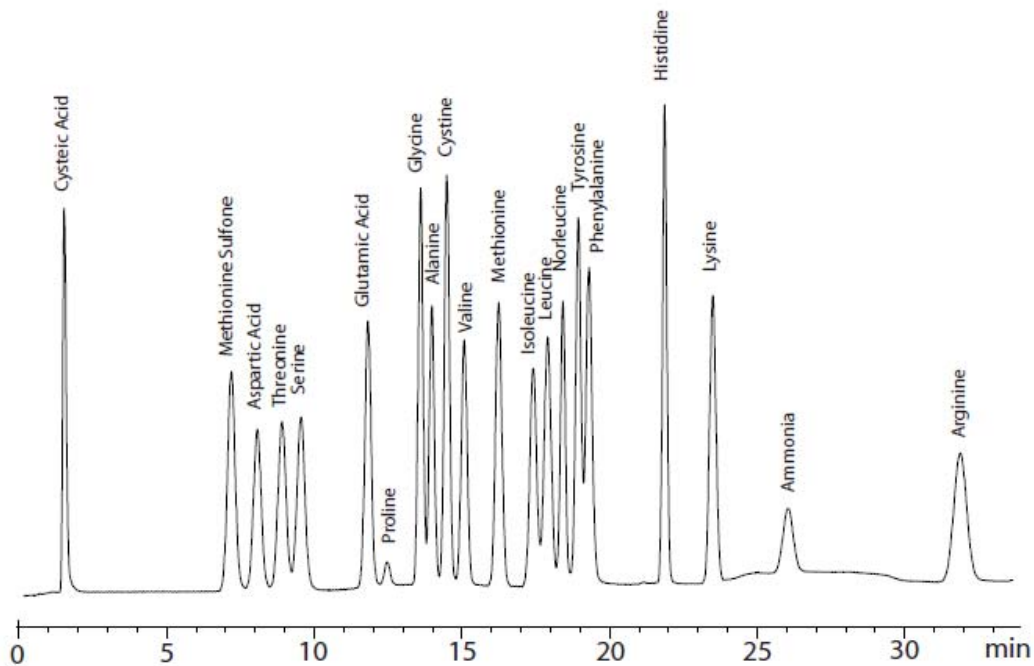
Laufzeit: 33 Min

Equilibrierungszeit: 7 Min.

#### **Säulenofen Programm:**

Schritt	Zeit	Temp. °C
1	0	55
2	12	55
3	17	70
4	32	70
5	33	55

Chromatogramm eines Aminosäurenstandard für oxidierte Futtermittelhydrolysate:  
"High Efficiency" Ionenaustauschersäule, 4.6 mm x 110mm, Na<sup>+</sup> Form (1154110T)  
Probe: Standard für Oxidierte Futtermittel: 0.25 µmol/mL (Bestell Nr.: 1700-0155)



Einzelne in Futtermitteln interessante Aminosäuren lassen sich auch mit noch wesentlich kürzen Laufzeiten analysieren:

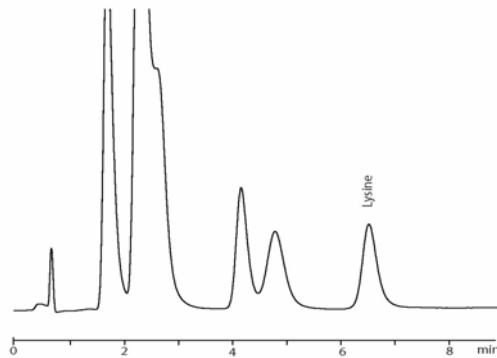
➤ Methode für schnelle Lysinbestimmung (9 Min.)

**Parameter:**

Flussraten: Eluent: 0.6ml/min  
Reagenz: 0.5ml/min  
Säulenofentemperatur: 60°C (kein Säulenofentemperaturgradient nötig)

**HPLC-Programm:**

Zeit , min	% Na640	% RG011
0	100	0
6	100	0
6.1	0	100
9	0	100
9.1	100	0
15	100	0



Laufzeit: 9 Min.

Equilibrierungszeit: 6 Min.

- **Methode für schnelle Bestimmung von Cysteinsäure, Methionin-Sulfon und Lysin (16 Min)**

**Parameter:**

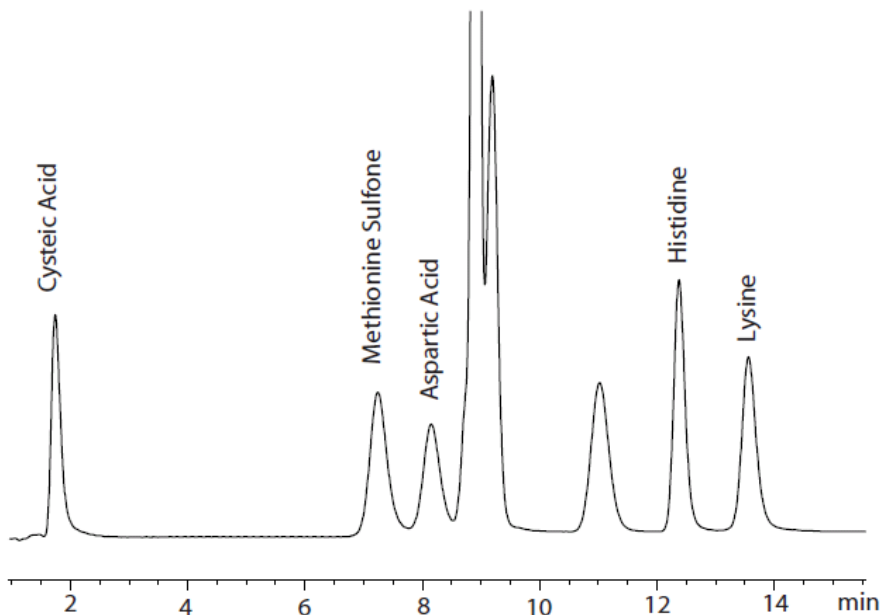
Flussraten: Eluent: 0.6ml/min  
Reagenz: 0.5ml/min  
Säulentemperatur: 55°C (kein Säulenofentemperaturgradient nötig)

**HPLC-Programm:**

Zeit , min	% Na270	% Na640	% RG011
0	100	0	0
5	100	0	0
5.1	0	100	0
12	0	100	0
12.1	0	0	100
16	0	0	100
16.1	100	0	0
23	100	0	0

Laufzeit: 16 Min.

Equilibrierungszeit: 7 Min.



## Aminosäureanalytik mit Lithium-Ionenaustauschersäulen

Für die Aminosäureanalytik nativer Proben wie z.B. Blut, Urin und Gewebe aber auch Lebensmittel und Getränke werden „Lithium“-Kits mit Lithiumcitratpuffern und einer Ionenaustauschersäule in der Lithiumform angeboten. Folgende Kits sind erhältlich:

**Für das Pinnacle PCX werden folgende Kits empfohlen:**

Methode	Reagenz	Bestell Nr.
Native Proben (70-Minuten Chromatogramm)*	TRIONE® T200	0352-0007
	TRIONE® T100C	0352-0006
	OPA	0352-0008

\* Es ist nicht möglich Norleucin als internen Standard zu benutzen, wir empfehlen z. B. Glucosamin-Säure zu verwenden

## Methode: Physiologische und native Proben

### Physiologische Proben: 70-Minuten-Chromatogramm

"High Efficiency" Ionenaustauschersäule- (0354675T); 4.6 x 75 mm; Li<sup>+</sup> Form

Pickering-Kit 0352-0006, 0352-0007 oder 0352-0008 für physiologische Proben

#### Parameter:

Flussrate: Eluent: 0.55 ml/min  
Anfangstemperatur der Säule:: 34°C

#### HPLC Programm:

Schritt	Zeit	1700-1125 %	Li365 %	Li3 75 %	RG003 %	Vermerk
0	0	100	0	0	0	Injektion
1	10	100	0	0	0	Isokratisch
2	19	40	60	0	0	Linearer Gradient
3	32	0	100	0	0	Linearer Gradient
4	43	0	100	0	0	Isokratisch
5	43.1	0	0	100	0	Laufmitteländerung
6	57	0	0	100	0	Isokratisch
7	57.1	0	0	70	30	Laufmitteländerung
8	72	0	0	70	30	Isokratisch
9	72.1	100	0	0	0	Laufmitteländerung
10	88	100	0	0	0	Re-Equilibrierung

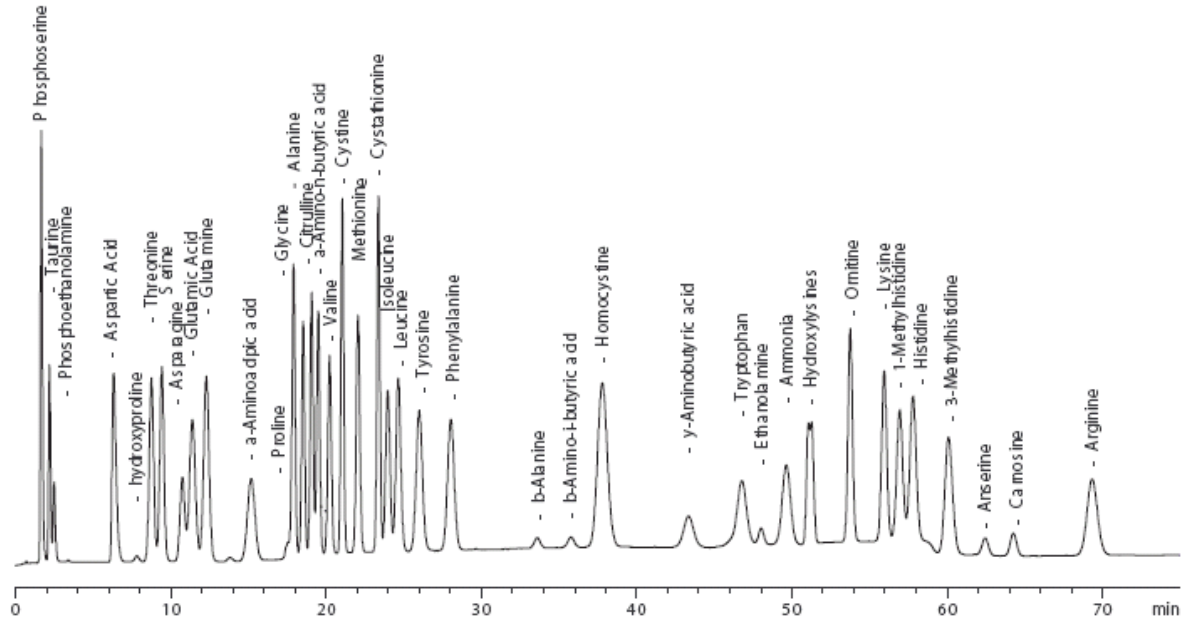
Laufzeit: 72 min

Equilibrierungszeit: 16 min

#### Temperaturprogramm des Säulenofens:

Zeit, min.	Temp., °C
0	34
6	34
17	65
25	70
70	70
71	34

Chromatogramm eines Aminosäurenstandards für native Proben  
"High Efficiency" Ionenaustauschersäule, 4.6 x 75 mm, Li<sup>+</sup> Form  
Probe: Lithium Calibration Standard, 0.25 µmol/mL (Bestell Nr. 1700-0170)



## Chemikalien und Säulen

### Nachsäulenderivatisierungs-Systeme

Bestellnummer	Beschreibung
1153-1022	PINNACLE PCX; einstufig 500 µL Reaktor für TRIONE® (Ninhydrin)
1153-1012	PINNACLE PCX; einstufig 150 µL Reaktor für OPA

### Applikations-Kits für die Analytik von Hydrolysaten

Bestell Nr.	Beschreibung	
<b>0352-0057</b>	<b>33-Min High Efficiency Kit für Proteinhydrolysate</b>	
1154110T	Na+ Ionenaustauschersäule	4.6 x 110 mm
1700-3102	Kit, Gard Holder & Cation GARD	2 Stk./Pack.
Na315	Na+ Eluent, pH 3.15	4 x 950 mL
Na425	Na+ Eluent, pH 4.25	4 x 950 mL
Na640	Na+ Eluent, pH 6.40	4 x 950 mL
RG011	Na+ Column Regenerant	950 mL
T100C	TRIONE® Ninhydrin Reagent, gebrauchsfertig (3 Monate Haltbarkeit ab Produktion)	4 x 950 mL
Na220	Na+ Diluent, pH 2.20	4 x 250 mL
012506H	Na+ Calibration Standard für Proteinhydrolysate, 0.25 µmol/mL	5 mL
<b>0352-0061</b>	<b>33-Min High Efficiency Kit für Kollagenhydrolysate</b>	
Kit wie 0352-0057, aber Standard wird ersetzt durch:		
012506C	Na+ Calibration Standard für Kollagenhydrolysate, 0.25 µmol/mL	5 mL
<b>0352-0058</b>	<b>Kit wie 0352-0057 jedoch mit T200 anstatt T100C</b>	
<b>0352-0062</b>	<b>Kit wie 0352-0061 jedoch mit T200 anstatt T100C</b>	
T200	TRIONE® zwei Komponenten Ninhydrin Reagenz	4x 900 mL
<b>0352-0059</b>	<b>Kit wie 0352-0057 mit nachstehenden Artikeln anstatt T100C</b>	
<b>0352-0063</b>	<b>Kit wie 0352-0061 mit nachstehenden Artikeln anstatt T100C</b>	
O120	o-Phthalaldehyde (OPA),	5 g
OD104	OPA Diluent,	4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor™	10 g

<b>0352-0020</b>	<b>33-Min High Efficiency Kit für oxidierte Futtermittelhydrolysate</b>	
1154110T	Na+ Ionenaustauschersäule	4.6 x 110 mm
1700-3102	Kit, Gard Holder & Cation GARD	2 Stk./Pack.
Na270	Na+ Eluent, pH 2.70	4 x 950 mL
Na425	Na+ Eluent, pH 4.25	4 x 950 mL
Na640	Na+ Eluent, pH 6.40	4 x 950 mL
RG011	Na+ Column Regenerant	950 mL
T100C	TRIONE® Ninhydrin Reagent, Gebrauchsfertig (3 Monate Haltbarkeit ab Produktion)	4 x 950 mL
Na220	Na+ Diluent, pH 2.20	4 x 250 mL
1700-0155	Na+ Calibration Standard für Futtermittelhydrolysate; 0.25 µmol/mL	5 mL
<b>0352-0021</b>	<b>Kit wie 0352-0020 jedoch mit T200 anstatt T100C</b>	
<b>0352-0022</b>	<b>Kit wie 0352-0020 jedoch mit nachstehenden Artikeln anstatt T100C</b>	
O120	o-Phthalaldehyde (OPA)	5 g
OD104	OPA Diluent	4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor™	10 g

## Kits für die Analytik von physiologischen und nativen Proben

Bestell-Nr.:	Beschreibung	
<b>0352-0006</b>	<b>70-Min Kit für physiologische und native Proben</b>	
0354675T	Li+ Ionenaustauschersäule & 1700-0070 AA Test-Mix	4.6 x 75 mm
1700-3102	Kit, GARD Holder & Cation GARD	2 Stk./Pack.
1700-1125	Li+ Eluent, pH 2.80	4 x 950 mL
Li365	Li+ Eluent, pH 3.65	4 x 950 mL
Li375	Li+ Eluent, pH 3.75	4 x 950 mL
RG003	Li+ Column Regenerant	950 mL
T100C	TRIONE® Ninhydrin Reagent, Gebrauchsfertig	4 x 950 mL
Li220	Li+ Diluent, pH 2.20	4 x 950 mL
SP100	SERAPREP™	250 mL
UP100	URIPREP™	250 mL
1700-0170	Li+ Kalibrierstandard, ohne Norleucin und Alpha-Amino-β-Guanidin Propionsäure, 0.25 μmole/mL	5 mL
<b>0352-0007</b>	<b>Kit wie 0352-0006 jedoch mit T200 anstatt T100C</b>	
T200	TRIONE® zwei Komponenten Ninhydrin Reagent, nicht gebrauchsfertig	4 x 900 mL
<b>0352-0008</b>	<b>Kit wie 0352-0006 mit nachstehenden Artikeln anstatt T100C</b>	
O120	o-Phthalaldehyde (OPA)	5 g
OD104	OPA Diluent	4 x 950 mL
3700-2000	Thiofluor™	10 g

## Kationen-Austauschersäulen für die Aminosäure-Analytik

Um eine gleichbleibende Trennleistung der Säulen für die Aminosäureanalytik zu gewährleisten, wird jede einzelne Säule mit einem Kalibrierstandard unter den spezifischen Elutionsbedingungen getestet. Nach dem Bestehen einer strengen Qualitätskontrolle erhalten die Säulen eine Seriennummer und werden zusammen mit der Testchromatogramm verschickt.

Die Firma Pickering Laboratories hat sich auf die Herstellung von Trennsäulen für die Aminosäure-Analytik spezialisiert. Im Folgenden werden diese ausführlich beschrieben.



Obwohl die Vorsäulen-Derivatisierung mit anschließender Reversed-Phasen-Chromatographie bei einigen HPLC-Anwendern beliebt ist, ist ihre erfolgreiche Anwendung auf Proteinhydrolysate beschränkt., da es bei nativen Proben zu großen Matrixeffekten kommt!

Ohne eine aufwendige Vorbehandlung führen die Kohlenhydrate und organischen Säuren in Wein, die Fette in Tabak und die Makromoleküle in menschlichen Seren dazu, dass die Aminosäuren bei den einzelnen Matrixen zu unterschiedlichen Zeiten eluieren.

Bei Reversed-Phasen konkurrieren alle gelösten Substanzen gleichzeitig um die Wechselwirkung mit der stationären Phase. Die Bindung jeder einzelnen Substanz wird stark von der Konzentration aller in der Lösung vorhanden gelösten Stoffe beeinflusst! Im Gegensatz dazu ist die Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Nachsäulenderivatisierung stabiler und reproduzierbarer als die Vorsäulen-Analyse! Da die Chromatographie und die Derivatisierung zwei getrennte und völlig verschiedene Ereignisse darstellen, können beide auch einzeln und individuell optimiert werden.

Der Retentionsmechanismus in der Ionenaustauschchromatographie ist beinahe matrixunempfindlich.

Da die Sulfonsäure-Gruppen des Divinylbenzol-Polymers, welche die stationäre Phase darstellen, eine hohe Ionenaustauscherkapazität besitzen, weisen die positiv geladenen Aminosäuren eine hohe Affinität für diese negativen Stellen auf! Infolgedessen werden alle Aminosäuren, mit Ausnahme der sehr Sauren, in einem engen Band auf der Säule fokussiert, während der Rest der Probenmatrix fast ungehindert weiterwandert.

Deshalb kann dasselbe Programm, welches bei jenem Labor für die Analytik von Wein verwendet wird, bei einem Anderen für die zur Analyse von menschlichem Urin verwendet werden.

Der wichtigste Unterschied zwischen Ionenaustauscherharzen und die Reversed-Phase Kieselsäuren ist die chemische Selektivität. Gebundene Reversed-Phasen-Kieselsäuren wurden hergestellt, um monotypisch chromatographische Verhalten zu zeigen wie z. B. Partitioning.

Im Gegensatz dazu sind die Ionenaustauscher-Harze polytypisch. Die Trennung basiert nicht nur auf Ionen-Austausch, sondern auch auf Partitioning, Adsorption, Ionen-Ausschluss und vielem mehr. Wegen der Beteiligung von so vielen Retentionsmechanismen kann eine einzige Änderung eines Parameters wie z. B. Kationenkonzentration, pH-Wert, Flussrate, Säulentemperatur, in vielfältigen Änderungen der Peakpositionen resultieren. Diese Flexibilität ist besonders von Vorteil wenn man z.B. eine Methode zur Optimierung der Trennung einiger gerade interessanter Aminosäuren auf Kosten der Anderen entwickeln möchte, wie z.B. bei der PIKU-Methode oder anderen schnellen Screenings.

Zudem bietet Pickering auch eine neue Vorsäule an, die Kationenaustauscher **GARD™ Säule**:

Die neue GARD™ Vorsäule wird empfohlen, um die HPLC Säule vor Verunreinigungen durch die Matrix zu schützen. Dadurch lassen sich erhebliche Folgekosten vermeiden. Die GARD™ verlängert die Lebensdauer Ihrer HPLC Säule ohne Peakverbreiterung oder zusätzlichen Druck. Die GARD™ Vorsäule ist sehr einfach zu handhaben und auch preislich sehr attraktiv und kann für nahezu alle Kationenaustauscher-Applikationen verwendet werden.

## Kationenaustauschersäulen für die Analyse von Proteinhydrolysaten

- 1) Konstante Säulentemperatur oder Temperaturgradient
- 2) „High-Efficiency“- 30 Minuten (mit Temperaturgradient) oder 55 Minuten (ohne Temperaturgradient) Analyse

Bestellnummer	Beschreibung
1154110T	High-Efficiency Analytische Säule (30 Minuten) für die Analyse von Protein und Kollagenhydrolysaten oder Schwefel sowie Aminosäurehydrolysaten in Futtermitteln, Kationenaustauscher, Na <sup>+</sup> -Form, 4.6 x 110 mm
1193250	Standard Analytical Column (60 Minuten) für die Analyse von Protein- und Kollagenhydrolysaten, Kationenaustauscher, Na <sup>+</sup> -Form, 3 x 250mm
1154150T	High Efficiency Analytical Column (55 Minuten) für die Analytik von Protein- und Kollagenhydrolysaten sowie oxidierten Futtermittelhydrolysaten, Kationenaustauscher, Na <sup>+</sup> -Form, 4 x 150 mm
1192020	Vorsäule, Na <sup>+</sup> -Form, 2 x 20 mm
1700-3102	Kit, GARD Holder & Cation GARD

## Kationenaustauschersäulen für die Analyse von nativen bzw. physiologischen Proben

1. Konstante Säulentemperatur oder Temperaturgradient
2. High Efficiency – 70 Minuten oder High Efficiency 95 Minuten Analyse (beide mit Temperaturgradient)

Bestellnummer	Beschreibung
0354675T	High-Efficiency Analytical Column (70 Minuten) für die Analyse von nativen bzw. physiologischen Proben, Kationenaustauscher, Li <sup>+</sup> -Form, 4.6 x 75 mm (keine Trennsäule verfügbar)
0354100T	High-Efficiency Analytical Column (95 oder 120 Minuten) für die Analyse von nativen bzw. physiologischen Proben, Kationenaustauscher, Li <sup>+</sup> -Form, 4.0 x 100 mm
0352020	Vorsäule, Li <sup>+</sup> -Form, 2.0 x 20 mm
1700-3102	Kit, GARD Holder & Cation GARD

## TRIONE® Ninhydrin Reagenz



- 1) Lagerung bei Raumtemperatur
- 2) Optimales Signal Rausch Verhältnis
- 3) Optimales Signal Rausch Verhältnis, dadurch hohe Detektionsempfindlichkeit

TRIONE® ist eine Ninhydrin Reagenz welches hauptsächlich für die Aminosäureanalytik hergestellt wird. Es ist so stabil, dass es weder beim Transport, noch bei der Lagerung oder in der Reagenzflasche Kühlung benötigt

Die Quantifizierung ist vom Ersten bis zum Letzten Milliliter gleichbleibend, wodurch ein Verwerfen der Reste vermieden wird! Das hohe Signal-Rausch-Verhältnis von TRIONE im Vergleich zu Reagenzien, welche DMSO enthalten, erlaubt die Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit mit einer minimalen Erhöhung des Hintergrundgeräusches – eine Eigenschaft welche besonders bei einer Probenkonzentration von < 50 pmol sehr geschätzt wird.

TRIONE® ist eine patentierte Lösung aus Ninhydrin, Hydrindantin (reduziertes Ninhydrin) in Lithiumacetatpuffer und Sulfolan, ein mit

Wasser mischbares organisches Lösungsmittel. Sulfolan wird benötigt um die Löslichkeit von Hydrindantin und Ruhmanns Violett (Produkt der Reaktion von Ninhydrin mit primären Amin) in Wasser zu gewährleisten.

Der Puffer ist erforderlich da die Reaktion pH-abhängig ist. Die aktiven Inhaltsstoffe – Ninhydrin und Hydrindantin – werden für die optimale Entstehung von sekundären bzw. primären Amin benötigt.

TRIONE® ist in zwei verschiedenen Formen erhältlich:

### T100C

- 1) Gebrauchsfertig
- 2) Drei Monate haltbar

### T200

- 1) Zwei Lösungen, die vor Gebrauch gemischt werden
- 2) Getrennt zwölf Monate haltbar, nach dem Mischen noch drei Monate

Bestellnummer	Beschreibung
T100C	TRIONE® Ninhydrin Reagenz, 4 x 950 mL
T200	TRIONE® Ninhydrin Reagenz, 2 Lösungen zum Mischen, 4 x 900 mL

## 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 1- 30 sec abgeschlossen. Die Produkte aus dieser Reaktion, 1-alkyl-2-alkylthio-substituierte-Isoindole haben bei 330 nm die optimale Anregungswellenlänge und bei 465nm die maximale Emission.

Um das OPA-Reagenz für Tage und nicht nur Stunden haltbar zu machen, ist es für ein sauerstoffempfindliches Reagenz wie OPA notwendig, die reinsten Chemikalien zu verwenden und das Reagenz unter Inertgasatmosphäre zu lagern und zu gebrauchen. 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 dass sich das Signal/Rauschverhältnis ändert. Jedem Reagenz liegt eine genaue Beschreibung bei, wie Sie das Reagenz in Ihrem Labor in einigen Minuten herstellen können!

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
0120	o-Phthalaldehyd (OPA), "Chromatographic Grade™", 5 g

## o-Phthalaldehyd Diluent

Für die Aminosäure-Analytik bietet Pickering einen Na-Boratpuffer mit pH 10.4 an, der auch saure Eluenten abpuffert.

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

## Thiofluor<sup>®</sup>

Thiofluor<sup>®</sup> der Firma PICKERING ist ein kristallines, beinahe geruchloses, schwer flüchtiges Nukleophil. Seine mit OPA und primären Aminen gebildeten Isoindol-Derivate sind bei gleichen Fluoreszenzeigenschaften stabiler als die des üblicherweise verwendeten 2-Mercaptoethanols. Im Gegensatz zum flüchtigen 2-Mercaptoethanol, verschwindet das Thiofluor nicht durch das Gasmanifold und den Druckregler.

Bestellnummer	Beschreibung
3700-2000	Thiofluor <sup>®</sup> , "Chromatographic Grade <sup>TM</sup> ", 10 g

## Eluentenpuffer und Regeneranten

- 1) „Chromatographic Grade™“
- 2) Garantierte pH-Stabilität
- 3) Optimales Signal-Rausch-Verhältnis
- 4) Kostengünstig durch lange Lebensdauer
- 5) Konstante Elutionsprofile, Flasche für Flasche
- 6) Keine Kühlung nötig

Es gibt vor allem zwei Wechselwirkungen die bei der Trennung von Aminosäuren auf Ionenaustauschersäulen maßgeblich beteiligt sind: *Titration und konkurrierender Ionenaustausch*.

Bei der Titration, gemeint ist die Erhöhung des pH-Wertes, werden die Aminosäuren von der positiv geladenen Form in die Neutrale überführt und verlieren die Wechselwirkung mit der anionisch stationären Phase. Der pH-Wert, an dem eine Aminosäure nach außen neutral wird (isoelektrischer Punkt) ist für jede Aminosäure charakteristisch und trägt wesentlich zur Selektivität bei.

Der andere Mechanismus ist der konkurrierende Ionen-Austausch. Die positiv geladenen Aminosäuren zeigen eine höhere Affinität zur stationären Phase als die Kationen im Elutionsmittel ( $\text{Na}^+$  oder  $\text{Li}^+$ -Ionen). Die Aminosäuren werden daher erst mit zunehmender Kationenkonzentration im Elutionsmittel von den anionischen Sulfonyl-Gruppen verdrängt und eluiert.

Man unterscheidet grundsätzlich Eluenten mit  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{Li}^+$ -Kationen, je nachdem ob man Hydrolysate oder native Proben bestimmen will. Die Verwendung eines  $\text{Li}^+$ -Eluenten (schwächere Wechselwirkung mit der Sulfonyl-Gruppe) ermöglicht die Trennung von bis zu 60 Aminosäuren in einem Lauf (native Proben). Weil die Anzahl an Aminosäuren in Hydrolysaten wesentlich geringer ist (gewöhnlich bis zu 21) reichen  $\text{Na}^+$ -Eluenten, um in kürzerer Zeit alle Aminosäuren zu eluieren.

Aminosäureanalysatoren erreichen die Selektivität der Trennung durch eine stufenweise isokratische Elution mit bis zu fünf Puffern, die in pH-Wert und Kationenkonzentration variieren. Pickering macht sich dagegen die Entwicklung der modernen HPLC-Technik zu Nutze und eluiert die Aminosäuren mit einem ternären, linearen Gradienten. Dies erleichtert die Methodenentwicklung und führt zu einer ruhigeren Basislinie und somit zu einer erhöhten Sensitivität.

Diese Eluenten sind sauerstoffunempfindlich, vorentgast und müssen nicht kühl aufbewahrt werden. Sie sollten dennoch nicht offen stehen, da sich Aminosäuren und Amine aus der Luft in den Puffern lösen und im Chromatogramm stören können. Alle Eluenten sind in Polyethylenflaschen von 950 mL abgefüllt. Die Kationhydroxid-Regeneranten sind in einzelne Flaschen von 950 mL abgefüllt, da nur geringe Mengen bei jeder Analyse verwendet werden. Die Probediluenten sind in einer Verpackung mit vier 250 mL Borosilikatflaschen erhältlich.

Bestellnummer	Beschreibung
<b>Natriumpuffer für Hydrolysate</b>	
Na270	Natriumeluent, pH 2.70, 4 x 950 mL
Na315	Natriumeluent, pH 3.15, 4 x 950 mL
Na328	Natriumeluent, pH 3.28, 4 x 950 mL
Na425	Natriumeluent, pH 4.25, 4 x 950 mL
Na640	Natriumeluent, pH 6.40, 4 x 950 mL
Na740	Natriumeluent, pH 7.40, 4 x 950 mL
1700-0112*	Natriumeluent, pH 3.15, 4 x 950 mL, mit 5 % Sulfolan
1700-0114*	Natriumeluent, pH 3.15, 4 x 950 mL, mit 2.5 % Sulfolan
RG011	Säulenregenerant, Na <sup>+</sup> -Form, 950 mL
* zum Gebrauch mit 1154150T mit Serien Nr. 1314	
<b>Lithiumpuffer für physiologische und native Proben</b>	
Li275	Lithiumeluent, pH 2.75, 4 x 950 mL
1700-1125	Lithiumeluent, pH 2.80, 4 x 950 mL
Li280	Lithiumeluent, pH 2.80, 4 x 950 mL
Li292	Lithiumeluent, pH 2.92, 4 x 950 mL
Li357	Lithiumeluent, pH 3.57, 4 x 950 mL
Li365	Lithiumeluent, pH 3.65, 4 x 950 mL
Li375	Lithiumeluent, pH 3.75, 4 x 950 mL
Li750	Lithiumeluent, pH 7.50, 4 x 950 mL
RG003	Säulenregenerant, Li <sup>+</sup> -Form, 950 mL

## Probendiluenten

Diese gebrauchsfertigen Diluenten gewährleisten einen gleich bleibenden pH-Wert und eine konstante Ionenkonzentration der Proben unabhängig von Ursprung und Vorbehandlung. Somit wird die Reproduzierbarkeit der Methode wesentlich erhöht. Benutzen Sie Na220 für Hydrolysate und Li220 für native Aminosäureproben.

Bestellnummer	Beschreibung
Na220	Probendiluent, Na <sup>+</sup> -Form, pH 2.20, 4 x 250 mL, „Chromatographic Grade™“
Li220	Probendiluent, Li <sup>+</sup> -Form, pH 2.20, 4 x 250 mL, „Chromatographic Grade™“

## SERAPREP® und URIPREP®

- 1) „Chromatographic Grade™“
- 2) Für die Vorbereitung von nativen Proben
- 3) Gewährleistet Reproduzierbarkeit von schnell eluierenden Peaks
- 4) Gleicht Pufferkapazität der Probe aus
- 5) Geringe bis keine pH-Einstellung der Probe mehr nötig
- 6) Mischen, zentrifugieren, filtern, injizieren



Native Aminosäuren sind in freier Form in Serum, Urin und anderen physiologischen Proben, Pflanzenextrakten, Nahrungsmitteln und Getränken enthalten. Obwohl die Probenvorbereitung wesentlich einfacher und schneller ist als für Proteinhydrolysate können der pH-Wert, die Normalität und lösliche Proteine einen großen Einfluss auf das Chromatogramm haben. Insbesondere die früheluierenden Aminosäuren Taurin, Urea, Asparaginsäure, Threonin und Serin, etc. sind sehr empfindlich gegen pH-Wert und Normalität, was sich in einer Verschiebung und schlechten Trennung am Anfang des Chromatogramms bemerkbar macht. Deshalb müssen die Proben in einem sehr engen pH-Bereich von 2,1 bis 2,5 und in der richtigen Lithiumkonzentration eingestellt sein.

**SERAPREP® und URIPREP®** ersetzen die gewöhnlichen Reagenzien für die Fällung von Proteinen wie Acetonitril, Trichloressigsäure und Pinkrinsäure und machen Dialyse, Ultrafiltration und -Zentrifugation und pH-Einstellung überflüssig.

**SERAPREP®** wird für die Vorbereitung von Serum und anderen Proben mit einer hohen Pufferkapazität wie z.B. Sardinenöl verwendet.

**URIPREP®** wird für die Vorbereitung von Urin und anderen Proben mit einer niedrigen Pufferkapazität wie z.B. Orangensaft oder Wein verwendet.

1. Mischen Sie in einem Microzentrifugenglas gleiche Mengen an Probe und SERAPREP® oder URIPREP®
2. Ca. 5 Minuten stehen lassen. Die Mischung bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugieren. Prüfen den pH-Wert des Überstands um sicherzustellen, dass dieser sich im Bereich 2.3 ±0.2 befindet. Im Bedarfsfall das Mischungsverhältnis anpassen!
3. Filtern Sie den Überstand mit einem Spritzenfilter (0,2 oder 0,45 µm). Füllen Sie das injektionsbereite Filtrat in ein Autosampler-Fläschchen.
4. Wenn eine weitere Verdünnung benötigt wird, verwenden Sie Li220 um die Konzentration der Analyten einzustellen!

Bestellnummer	Beschreibung
SP100	SERAPREP <sup>®</sup> , zur Vorbereitung von Serumproben, 250 mL
UP100	URIPREP <sup>®</sup> , zur Vorbereitung von Urinproben, 250 mL

## Aminosäure-Testmischungen (1700-0070)

L-Cysteinsäure  
L-Threonin  
L-Serin

Diese Testmischung ist in 0,01 N HCL gelöst und hat eine Konzentration von 0.25 µmol/mL. Alle drei Aminosäuren werden mit dem ersten relativ sauren Puffer (Na328, Na315, Li275 oder Li280) isokratisch eluiert. Da Cysteinsäure von der stationären Phase nicht zurückgehalten wird, kann man über die Retentionszeit das Totvolumen des Systems ermitteln. Die Qualität der Auflösung zwischen Threonin und Serin ist ein Indikator für mögliche Undichtigkeiten, das Totvolumen des Systems und die Trennleistung der Säule.

## Aminosäurestandards

- 1) Quantitativ
- 2) Chromatographisch reine Startkomponenten
- 3) Jede Charge wird durch Aminosäuren-Analytik getestet

Aminosäurestandards der Firma Pickering Laboratories haben weltweit einen guten Ruf für Qualität und Verlässlichkeit in allen Nachsäulensystemen und Methoden. Sechs verschiedene Testmischungen stehen für eine Vielzahl von Applikationen zur Verfügung. Mit Ausnahme der Drei-Komponenten-Testmischung (1700-0700), sind die Standards mit einem passenden Citratpuffer in ein 5 mL Fläschchen abgefüllt. Obwohl die Standards bei der Firma Pickering gefroren gelagert werden, bleiben die Kalibrierstandards auch wenn sie bei Raumtemperatur verschickt werden stabil. Jedoch sollte man sie sofort nach Erhalt einfrieren.

CALIBRATION STANDARDS FOR AMINO ACID ANALYSIS									
CONSTITUENTS	1700-0180*	1700-0175*	011006P	012006P	1700-0150	012506C	012506H	1700-0155	1700-0170
Beta-Alanine	*		*	*					*
Alanine	*		*	*		*	*	*	*
D,L- $\alpha$ -Amino-adipic acid	*		*	*					*
Gamma-Amino butyric acid		*	*	*					*
Alpha-Amino-n-butyric acid	*		*	*					*
D,L,b-Amino-i-butyric acid	*		*	*					*
Alpha-Amino-Beta-guanidinopropionic acid			*	*					
Ammonia		*	*	*		*	*	*	*
Anserine		*	*	*					*
Arginine		*	*	*		*	*	*	*
Asparagine	*		*	*					*
Aspartic acid	*		*	*		*	*	*	*
Carnosine		*	*	*					*
Citrulline	*		*	*					*
Creatinine		*	*	*					*
Cystathionine	*		*	*					*
Cystine	*(1,25)		*	*		*	*		*
Cysteic acid								*	
Ethanolamine		*	*	*					*
Glutamic acid	*		*	*		*	*	*	*
Glycine	*		*	*		*	*	*	*
Histidine		*	*	*		*	*	*	*
D,L-Homocystine		*	*	*					*
L,L & allo-Hydroxylysine		*	*	*		*			*
4-trans-L-Hydroxyproline	*		*	*		*(1,25)			*
Isoleucine	*		*	*	*	*	*	*	*
Leucine	*		*	*	*	*	*	*	*
Lysine		*	*	*		*	*	*	*
Methionine	*		*	*	*	*	*		*
Methionine-D,L-sulfoxide						*			
Methionine-D,L-sulfone								*	
1-Methyl-histidine		*	*	*					*
3-Methyl-histidine		*	*	*					*
Norleucine			*						
Ornithine		*	*	*					*
Phenylalanine	*		*	*	*	*	*	*	*
Phosphoethanolamine	*		*	*					*
Phosphoserine	*		*	*					*
Proline	*		*	*		*(1,25)	*	*	*
Sarcosine	*		*	*					*
Serine	*		*	*		*	*	*	*
Taurine	*		*	*					*
Threonine	*		*	*		*	*	*	*
Tryptophan		*	*	*			*		*
Tyrosine	*		*	*	*	*	*		*
Urea	*		*	*					*
Valine	*		*	*		*	*	*	*

NOTE: Concentration of all the constituents in the Amino Acid standards is 0,25  $\mu$ mole/mL unless otherwise specified.  
 \*Concentration of all the constituents is 2,5  $\mu$ mole/mL unless otherwise specified