

исключением иминокислот, образуют продукт фиолетового цвета, имеющий максимум поглощения при 570 нм. Иминокислоты, такие как пролин, образуют продукт реакции желтого цвета, имеющий максимум поглощения при 440 нм. Продукты постколоночной реакции между нингидрином и элюируемыми из колонки аминокислотами детектируются при длинах волн 440 нм и 570 нм, а полученная хроматограмма используется для определения аминокислотного состава.

Предел обнаружения для большинства производных аминокислот обычно составляет 10 пмоль, а для производных пролина – 50 пмоль. Линейность сигнала наблюдается в области 20 – 500 пмоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 1 мкг.

МЕТОД 2. Пост-колоночная дериватизация с о-фталевым альдегидом (ОФА)

о-Фталевый альдегид (ОФА) реагирует с первичными аминами в присутствии тиольных соединений, образуя производные изоиндола, обладающие сильной флуоресценцией. Эта реакция используется для пост-колоночной дериватизации в аминокислотном анализе методом ионообменной хроматографии. Основные подходы к ионохроматографическому разделению такие же, как указано в Методе 1.

Поскольку ОФА не взаимодействует с вторичными аминогруппами (иминокислоты, такие как пролин) с образованием флуоресцирующих производных, для образования флуоресцирующих производных с ОФА вторичные амины предварительно окисляют натрием гипохлоритом или хлорамином Т. В методике используются ионообменные колонки на основе сильных катионообменников для разделения свободных аминокислот с последующим пост-колоночным окислением натрием гипохлоритом или хлорамином Т и пост-колоночной дериватизацией с использованием ОФА и