

каждой аминокислоты, кроме цистеина, находится в области от 40 до 320 фмоль. Предел обнаружения для цистеина составляет около 800 фмоль. Линейность сигнала наблюдается в области 2,5 – 500 мкмоль с коэффициентом корреляции более 0,999. Для получения удовлетворительных результатов рекомендуется использовать для гидролиза образцы белка/пептида массой более 30 нг.

МЕТОД 5. Предколоночная дериватизация с о-фталевым альдегидом (ОФА)

ОФА в присутствии тиольных соединений реагирует с первичной аминогруппой, образуя производные изоиндола с сильной флуоресценцией. Метод не позволяет определять вторичные аминокислоты (иминокислоты, например, пролин). В качестве тиольных соединений могут быть использованы 2-меркаптоэтанол и 3-меркаптопропионовая кислота. ОФА не обладает флуоресценцией и, следовательно, не образует мешающих пиков на хроматограмме. Кроме того, его растворимость и стабильность в водном растворе, наряду с высокой скоростью реакции, позволяют проводить автоматическую дериватизацию с использованием программируемого автоматического инжектора (автосэмплера) для смешивания испытуемого образца и реагента (-ов). Основным недостатком ОФА является его неспособность реагировать с вторичными аминокислотами (например, пролином). Компенсировать данный недостаток можно сочетанием с методиками, описанными в методах 7 или 8.

За предколоночной дериватизацией аминокислот с ОФА следует дальнейшее разделение смеси ОФА-производных аминокислот методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с последующим флуориметрическим детектированием. Так как ОФА-производные аминокислот неустойчивы, анализ методом ВЭЖХ проводят сразу после дериватизации. Использование программируемого автоматического инжектора для проведения дериватизации позволяет производить ввод проб в хроматограф строго через