

Wiederfindungsrate von Proben bei GPC-Analysen sicherstellen

PETER KILZ, PSS

Problemstellung Vergleichsanalysen zeigen eine unbefriedigende Wiederholbarkeit und die GPC/SEC-Ergebnisse zeigen Ergebnisdifferenzen, da die Peakflächen sich ändern.

Frage Wie kann sichergestellt werden, dass die injizierte Probenmenge komplett von der GPC-Säule eluiert und richtig detektiert wird? Was muss man beachten, damit Ergebnisse nicht von der Probenmenge abhängen und dadurch unzuverlässig werden?

Antwort Je komplexer die zu untersuchenden GPC/SEC-Proben sind, umso aufwändiger ist die Etablierung und Validierung einer GPC/SEC-Methode. Damit die GPC/SEC-Ergebnisse verlässlich sind, sollte man bei unbekannt-

ten GPC/SEC-Proben die Wiederfindungsrate bestimmen. Damit wird sichergestellt, dass alle gelösten Probenbestandteile auch korrekt detektiert und in die Auswertung einbezogen werden. Nur so sind die Voraussetzungen erfüllt, dass richtige und wiederholbare GPC/SEC-Resultate erzielt werden.

Am einfachsten lässt sich die Wiederfindungsrate bestimmen, indem man unter sonst identischen Messbedingungen die GPC/SEC-Säulen durch eine Kapillare ersetzt. Da die Kapillare nicht mit Trennmateriale gefüllt ist, können keine Probenbestandteile absorbiert werden und es findet keine Trennung statt. Das ist zur Bestimmung der Wiederfindung aber auch nicht nötig. Mit folgenden Schritten wird die Wiederfindungsrate bestimmt:

- GPC/SEC-System für reproduzierbare Analysen vorbereiten;
- Die Probe(n) im Eluenten lösen;
- GPC/SEC-Säule(n) durch eine Edelstahlkapillare (ca. 300 x 0,25 mm) ersetzen;
- Mindestens dreimal reinen Eluenten injizieren und Peakfläche (Fl_0) bestimmen;
- Mindestens dreimal die jeweilige Probe injizieren und Peakfläche (Fl_1) bestimmen;
- Die GPC/SEC-Säule(n) wieder einbauen und GPC-System equilibrieren;
- Mindestens dreimal reinen Eluenten injizieren und Peakfläche (Fl_b) bestimmen;
- Mindestens dreimal die jeweilige Probe injizieren und Peakfläche (Fl_p) bestimmen.

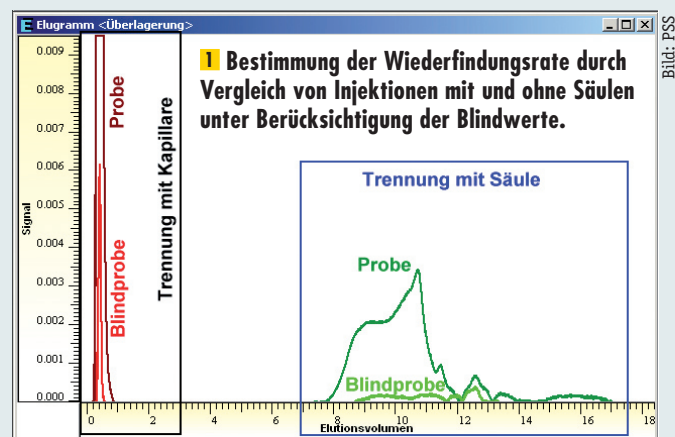


Bild: PSS

Die Wiederholmessungen sind nötig um ganz sicher zu gehen, dass das System reproduzierbar arbeitet und die bestimmten Peakflächen zuverlässig sind. Ausreißer kann man auf diese Weise schnell feststellen. Jetzt kann man die Wiederfindungsrate (in %), R, ganz einfach bestimmen: $R = 100\% \cdot \text{gemessene Peakfläche auf Säule(n)} / \text{gemessene Peakfläche auf Kapillare}$.

Damit Störpeaks (Luftpeaks, etc.) die Wiederfindungsrate nicht beeinflussen, muss von der Peakfläche der Probe noch der Blindwert einer Leerinjektion abgezogen werden:

$$R = 100\% \cdot (Fl_p - Fl_b) / (Fl_1 - Fl_0)$$

Fazit

- Durch spezifische Wechselwirkung werden GPC/SEC-Ergebnisse je nach Art der Proben erheblich beeinflusst.
- Selektive Absorption von Probenbestandteilen verhindert die komplette Analyse der Proben.
- Fehler in der Größenordnung von 30 Prozent können leicht auftreten.
- Stellen Sie sicher dass die Probe komplett von den GPC/SEC-Säulen eluiert, indem Sie die Wiederfindungsrate schnell und einfach bestimmen.

Alle bisher erschienenen Tipps & Tricks finden Sie online unter www.laborpraxis.de/tippsandtricks.

+49 (0) 61 31 / 9 62 39 - 0

Thema der nächsten Ausgabe: Besonderheiten bei der Charakterisierung von Proteinen