

Molmassenkalibration – aber richtig

Problemstellung

Um Molmassenverteilung und -mittelwerte zu bestimmen, muss die GPC kalibriert werden. Bei dem am häufigsten verwendeten Verfahren werden Molmassenstandards mit enger Molmassenverteilung verwendet. Die logarithmische Molmasse am Peakmaximum wird dann gegen das gemessene Elutionsvolumen aufgetragen. Anschließend werden die erhaltenen Datenpunkte sinnvoll gefittet.

Frage

Was ist eine sinnvolle Fitfunktion und wie kann man die Güte der gewählten Anpassung beurteilen?

Antwort

GPC-Kalibrationskurven sind, auch wenn Linear- oder Mixed-Bed-Säulen verwendet werden, nicht in allen Molmassenbereichen linear, deshalb müssen andere Funktionen als die lineare Anpassung gefunden werden. Falsch gewählte Fitfunktionen führen automatisch zu höheren Fehlern bei der Molmassenbestimmung. Um GPC-Kalibrationskurven sinnvoll anzufitten, sind Polynomfunktionen generell geeignet. Als Kriterien, um die Güte der gewählten Fitfunktion für die Kalibrierpunkte zu beurteilen, werden häufig verwendet:

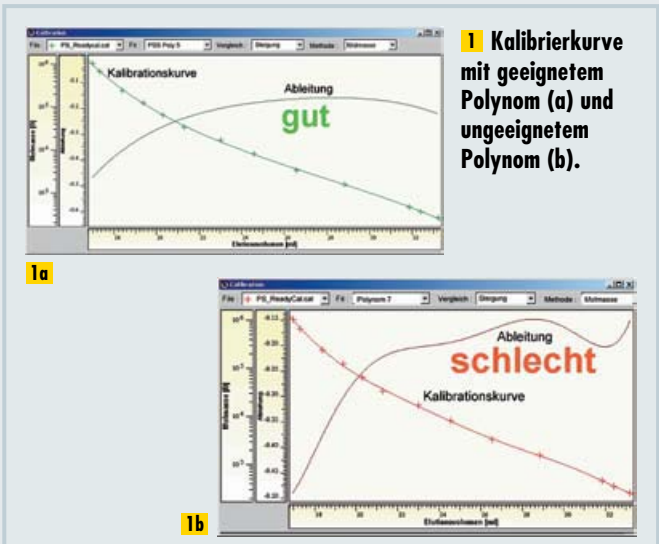
- Regressionskoeffizient R^2 ,
- Abweichung der Kalibrierpunkte von der Kalibrationskurve und der
- Verlauf der Steigung der Kalibrationskurve.

Von diesen drei Kriterien ist der Regressionskoeffizient der am wenigsten geeignete Parameter. Tabelle 1 zeigt die Regressionskoeffizienten für identische Messdaten (s. Abb. 1a und 1b) mit verschiedenen Fitfunktionen sowie die mittlere Abweichung der Datenpunkte. An diesen Werten erkennt man deutlich, dass der Regressionskoeffizient auch dann noch nahe bei 1 ist, wenn die mittlere Abweichung (und damit der Fehler in der GPC) nicht akzeptabel ist. Natürlich wird die mittlere Abweichung der Kalibrierpunkte von der Funktion mit zunehmender Ordnung des Polynoms immer geringer. Um sicherzustellen, dass die Kalibrierfunktion weiterhin physikalisch sinnvoll ist, muss deshalb die Steigung der Kalibrierkurve kontrolliert werden. Abbildung 1a zeigt einen idealen Verlauf. Die Steigung ändert sich nur zur Trennschwelle und zur Ausschlussgrenze hin und ist an-

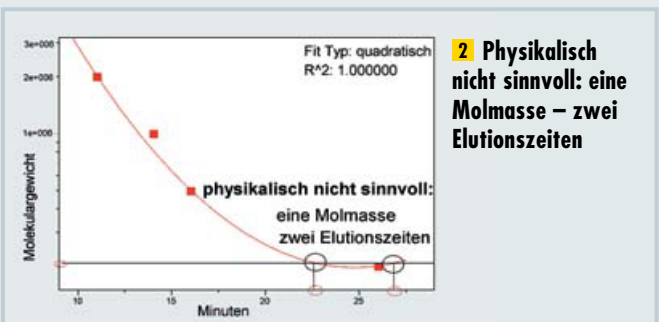
Tabelle 1: Regressionskoeffizienten für identische Messdaten

Anpassung	R^2	Mittlere Abw.
Linear	0,9894	33,90%
Polynom 3	0,9997	5,44%
Polynom 5	0,9998	3,99%
Polynom 7	0,9999	3,41%

sonsten konstant. Wird das Polynom siebter Ordnung gewählt, dann ändert sich die Steigung der Kalibrierkurve. Diese zeigt Maxima und Minima, die keine physikalische Grundlage haben.



1 Kalibrierkurve mit geeignetem Polynom (a) und ungeeignetem Polynom (b).



2 Physikalisch nicht sinnvoll: eine Molmasse – zwei Elutionszeiten

Fazit

- Kalibrationskurven müssen physikalisch sinnvoll sein. Verläufe mit zwei Elutionszeiten für ein Molekulargewicht sind unsinnig (s. Abb. 2).
- Die Kalibrierpunkte sollten geringe Abweichungen haben.

Im Zweifel entscheidet die Steigung der Kalibrierkurve: zeigt diese Maxima oder Minima, ist dieses Polynom nicht geeignet. Ein Polynom geringerer Ordnung muss verwendet werden.

Tel. +49 (0 61 31) 9 62 39 - 31