# DIN CEN ISO/TS 23973

ICS 71.040.50

Ersatz für
DIN SPEC 91070:2017-10

## Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen – Chemische Heterogenität von Polyethylenoxiden (ISO/TS 23973:2020); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 23973:2021

Liquid chromatography at critical conditions (LCCC) –
Chemical heterogeneity of polyethylene oxides (ISO/TS 23973:2020);
German version CEN ISO/TS 23973:2021

Chromatographie liquide aux conditions critiques –
Hétérogénéité chimique des oxydes de polyéthylène (ISO/TS 23973:2020);
Version allemande CEN ISO/TS 23973:2021

Gesamtumfang 56 Seiten

DIN-Normenausschuss Beschichtungsstoffe und Beschichtungen (NAB)
DIN-Normenausschuss Kunststoffe (FNK)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Nationales Vorwort

Der Text von ISO/TS 23973:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 35 „Paints and varnishes“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als CEN ISO/TS 23973:2021 durch das Technische Komitee CEN/TC 139 „Lacke und Anstrichstoffe“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 002-00-02-03 AK „Gelpermeations-chromatographie“ des Arbeitsausschusses NA 002-00-02 AA „Lackrohstoffe“ im DIN-Normenausschuss Beschichtungsstoffe und Beschichtungen (NAB).

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Erfahrungen mit dieser Technischen Spezifikation sind erbeten:

— vorzugsweise als Datei per E-Mail an nab@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;

— oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Beschichtungsstoffe und Beschichtungen (NAB), 10772 Berlin.

**Änderungen**

Gegenüber DIN SPEC 91070:2017-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

a) der Status wurde durch die Übernahme der Europäischen Technischen Spezifikation CEN ISO/TS 23937 geändert;

b) das Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

**Frühere Ausgaben**

DIN SPEC 91070: 2017-10



Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

TECHNISCHE SPEZIFIKATION

TECHNICAL SPECIFICATION

SPÉCIFICATION TECHNIQUE

# CEN ISO/TS 23973

Dezember 2021

ICS 71.040.50

Deutsche Fassung

# Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen — Chemische Heterogenität von Polyethylenoxiden (ISO/TS 23973:2020)

Liquid chromatography at critical conditions (LCCC) — Chemical heterogeneity of polyethylene oxides (ISO/TS 23973:2020)

Chromatographie liquide aux conditions critiques — Hétérogénéité chimique des oxydes de polyéthylène (ISO/TS 23973:2020)

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 5. Dezember 2021 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.

EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

**CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel**

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 3
Vorwort ... 4
Einleitung ... 5
1 Anwendungsbereich ... 6
2 Normative Verweisungen ... 6
3 Begriffe ... 6
4 Kurzbeschreibung ... 7
5 Gerät ... 7
5.1 Allgemeines ... 7
5.2 Elutionsmittelversorgung ... 8
5.3 Pumpe ... 8
5.4 Injektionssystem ... 9
5.5 Trennsäulen ... 9
5.6 Temperiereinrichtungen der Säule ... 10
5.7 Detektoren ... 10
5.8 Elutionsmittel ... 10
5.9 Datenerfassung ... 10
6 Probenvorbereitung ... 10
7 Durchführung der Messungen ... 11
7.1 Bestimmung der kritischen Bedingungen ... 11
7.2 Analyse des Validierungs-Kit ... 12
8 Prüfbericht ... 13
Anhang A (informativ) Fehlerquellen ... 15
Anhang B (informativ) Auswertung des Ringversuchs ... 16
Anhang C (informativ) Elugramme der Teilnehmer (Auszüge) ... 24
Anhang D (informativ) Untersuchungen zur Langzeitstabilität des Prüfgemischs ... 48
Literaturhinweise ... 54



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Europäisches Vorwort

Der Text von ISO/TS 23973:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 35 „Paints and varnishes“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 139 „Lacke und Anstrichstoffe“ als CEN ISO/TS 23973:2021 übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

**Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO/TS 23973:2020 wurde von CEN als CEN ISO/TS 23973:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

AVA Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 35, *Paints and Varnishes*, erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Einleitung

Seit der erstmaligen Beschreibung der Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen (LCCC, en: liquid chromatography at critical conditions) 1986 (siehe Literaturhinweis [1]) wurde das Verfahren stets weiterentwickelt und hat sich in der Polymercharakterisierung als unentbehrlich erwiesen. Die Trennung ist nicht nur für die quantitative Analyse der einzelnen Spezies notwendig. Sie bietet auch die Voraussetzung für die qualitative Charakterisierung der Fraktionen mittels spektroskopischer und spektrometrischer Techniken. Entscheidend ist hierbei die Herabsetzung der Polydispersität/chemischen Heterogenität innerhalb einer Fraktion, welche für massenspektrometrische Untersuchungen ein großes Problem darstellt.

Das Verfahren ist in den letzten zwei Jahrzehnten in der Fachwelt ausführlich für unterschiedliche Polymersysteme beschrieben worden, siehe Literaturhinweise [2] bis [9].

Im Rahmen der Arbeit des Technischen Komitees wurde durch Ringversuche geklärt, inwieweit das Verfahren übereinstimmende Ergebnisse für ein einfaches, chemisch heterogenes Polymergemisch liefert.

Zu diesem Zeitpunkt wurden bei keinem der teilnehmenden Laboratorien die für die Auswahl des Systems erforderlichen Erfahrungen (Zusammenspiel von Polarität/Trennphase/Elutionsmittel/Probe) vorausgesetzt.

Die Ringversuche haben gezeigt, dass auch bei einem gut charakterisierten System sowie der Vorgabe aller einschlägigen Systemparameter das Verfahren bisher nicht als Routine-Verfahren in Laboratorien mit Erfahrung in Polymeranalytik eingestuft werden kann.

Es liegt die Überlegung nahe, einen Validierungs-Kit (Polymergemisch mit dem zu erwartenden Trennergebnis) anzubieten.

AVA Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein gültiges Verfahren für die Trennung von chemisch heterogenen Gemischen von Polyethylenoxid (PEO) und die Ermittlung der Anzahl sowie des Gehaltes der chemisch heterogenen Spezies in der Gesamtprobe.

Das in diesem Dokument dargestellte Verfahren dient als technischer Leitfaden und soll Laboratorien befähigen, das Prinzip der „kritischen Chromatographie“ an einem validierten System zu erlernen.

Auf Grund der Vielfalt der Wechselwirkungen Polymer/mobile Phase/stationäre Phase und der dadurch zur Verfügung stehenden Anzahl der Trennsysteme ist dieses Verfahren mit den angegebenen Systemparametern nicht allgemeingültig für andere Polymerklassen.

Die Auswertung der Ringversuche hat gezeigt, dass viele Fehlerquellen in der Technik der Flüssigchromatographie allgemein zu suchen sind. Mögliche Fehlerquellen werden im Anhang A beschrieben.

Anhang B enthält Angaben zur Evaluierung des Ringversuchs.

Elugramme der Teilnehmer (Auszüge) sind im Anhang C enthalten.

Untersuchungen zur Langzeitstabilität des Prüfgemisches sind im Anhang D aufgeführt.

# 2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

# 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter http://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: verfügbar unter http://www.electropedia.org/

**3.1**
**Flüssigchromatographie unter kritischen Bedingungen**
**LCCC**, en: Liquid Chromatography at Critical Conditions
Sonderform der Flüssigchromatographie von Polymeren am Punkt der Adsorption, wo chemisch und strukturell identische Polymere mit einer bestimmten Wiederholeinheit unabhängig von der Molmasse zur selben Retentionszeit eluieren

Anmerkung 1 zum Begriff: Die einzelnen Monomereinheiten tragen nicht zur Retention bei. Unter diesen ermittelten Systemparametern (definierte Kombination Trennsäule/Elutionsmittelgemisch/Temperatur) erfolgt eine Trennung von Polymergemischen derselben Wiederholeinheit nach chemischer Heterogenität. Chemische Heterogenitäten können unterschiedliche funktionelle Gruppen, Endgruppen, Unterschiede in der Mikrostruktur (z. B. Copolymere und deren Zusammensetzung) sowie topologische Unterschiede (z. B. Verzweigungen) sein.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# 4 Kurzbeschreibung

Im Folgenden wird das Verfahren zur Trennung von Polyethylenoxiden unter kritischen Bedingungen der Adsorption für die Ethylenoxidwiederholungseinheit beschrieben.

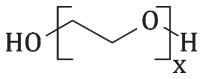
Drei Polyethylenglykole (PEG) mit unterschiedlicher Molmasse (1 mg/ml bis 2 mg/ml) werden im jeweiligen Elutionsmittelgemisch (siehe 7.1) gelöst und gemessen. Es wird mit einem hohen Anteil des thermodynamisch guten Lösemittels B (in diesem Fall Acetonitril) begonnen. Das Elutionsmittelgemisch wird durch Erhöhung der Komponente A (in diesem Fall Wasser) sukzessive verändert. Es folgen Messungen in unterschiedlichen Zusammensetzungen, bis alle drei Standards unabhängig von der Molmasse zur selben Retentionszeit eluieren. Die ermittelte kritische Lösemittelzusammensetzung (csc, en: critical solvent composition) entspricht den kritischen Bedingungen.

Nachfolgend werden die unbekannten Mischungen in diesem Elutionsmittelgemisch gelöst und gemessen.

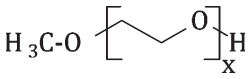
Aus den Peaks der resultierenden Chromatogramme kann die Anzahl der Spezies mit unterschiedlichen Funktionalitäten, sowie deren relativer Gehalt (unter Berücksichtigung der Detektionseigenschaften) ermittelt werden.

In den Mischungen enthaltene Spezies:

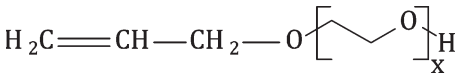
(1) Polyethylenglycol



(2) Methylenpolyethylenglycol



(3) Polyethylenglycolmonoallylether



# 5 Gerät

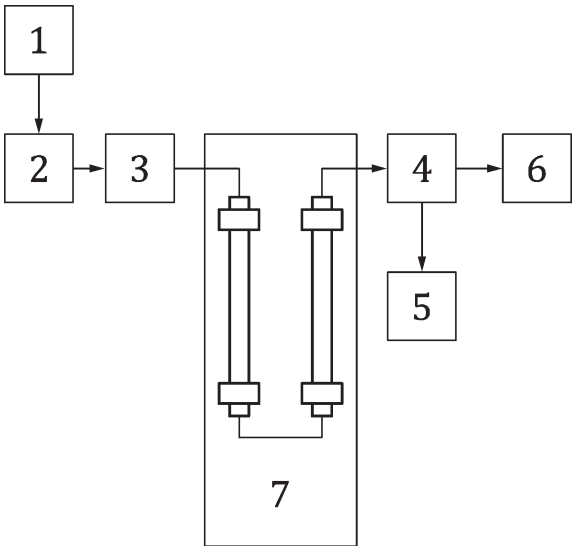
## 5.1 Allgemeines

Das Gerät muss aus den im Bild 1 gezeigten Komponenten bestehen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04




**Legende**
1 mobile Phase der LCCC
2 Pumpe, 0,1 ml/min bis 2 ml/min
3 Injektionsventil, Autosampler
4 Detektoren: RI, ELSD, Corona
5 Datenverarbeitung
6 Abfallmedien
7 Trennsäulen/Temperiereinrichtung

**Bild 1 — Gerät für die LCCC**

Alle Komponenten, die mit dem Elutionsmittel oder der Probenlösung in Berührung kommen, sind gegen diese beständig und zeigen keine Adsorptions- oder Memory-Effekte. Die einzelnen Module sollten für die Polymeranalytik im Allgemeinen mit Stahlkapillaren verbunden sein.

## 5.2 Elutionsmittelversorgung

Das Vorratsgefäß für das Elutionsmittel muss das Elutionsmittel ausreichend gegen äußere Einflüsse (Luftkontakt, Lichteinfall) abschirmen, gegebenenfalls unter Verwendung eines Schutzgases oberhalb der Flüssigkeitsoberfläche.

Das Vorratsgefäß für das Elutionsmittel muss eine ausreichende Menge an Elutionsmittel enthalten, um im Gerät ein Gleichgewicht herzustellen und mehrere Wiederholungsanalysen durchzuführen.

Funktionsstörungen der Pumpe oder die Bildung von Dekompressionsblasen im Detektor müssen durch Entgasen des Elutionsmittels vor dem Einfüllen in das Vorratsgefäß oder durch eine zwischen dem Vorratsgefäß und der Pumpe eingebaute Vorrichtung verhindert werden. Das Entgasungsverfahren (z. B. Blasenfalle, Online-Begasung mit Helium oder Vakuumentgasung) ist freigestellt, muss aber im Prüfbericht angegeben werden.

Für Polymergemische, die chromophore Gruppen enthalten, dürfen auch andere Detektoren, z. B. UV- oder IR-Detektoren, eingesetzt werden.

## 5.3 Pumpe

Die Pumpe sorgt für einen möglichst gleichmäßigen und pulsationsfreien Transport des Elutionsmittels durch die Trennsäulen. Der Durchfluss muss 0,5 ml/min bis 1 ml/min je nach den Abmessungen der verwendeten Säulen betragen. Zur Erfüllung dieser Aufgaben muss der optimale Förderbereich der Pumpe bei diesem



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

Durchfluss und dem sich dabei einstellenden Gegendruck liegen. Die Durchflussrate der eingesetzten Pumpe darf um höchstens 0,1 % abweichen.

## 5.4 Injektionssystem

Das Injektionssystem dient zum Einbringen einer exakt vorgegebenen Menge der Probenlösung (5 µl bis 25 µl) in einem möglichst scharf begrenzten Elutionsintervall in das chromatographische Trennsystem. Dieses Einbringen darf manuell oder automatisch erfolgen.

Beim Füllen und Einschleusen in den chromatographischen Flüssigkeitsstrom ist durch ausreichend große Spülvolumina sicherzustellen, dass auch bei Vorliegen von Laminar-Strömungseffekten das Volumen der Injektionsvorrichtung exakt mit dem Volumen der Probenlösung gefüllt und anschließend restlos wieder ausgespült wird.

Memory-Effekte im Injektionssystem durch vorhergehende Probenlösungen sind konstruktiv oder durch ausreichende Spülungen auszuschließen.

## 5.5 Trennsäulen

Das Trennsystem besteht aus einer oder mehreren hintereinandergeschalteten Säulen, die mit einem kugelförmigen ($d < 10$ µm) porösen Trennmaterial gefüllt sind, wobei der Durchmesser der Porenöffnungen der Knäuelgröße der zu untersuchenden Polymermoleküle entspricht (für das hier beschriebene Verfahren 80 Å bis 300 Å).

In Abhängigkeit von der molaren Masse der zu untersuchenden Proben ist gegebenenfalls die Porengröße des Trennmaterials anzupassen.

Das Trennmaterial besteht hier aus einer unpolaren/hydrophoben stationären Phase (octadecyl-modifiziertes Kieselgel, Umkehrphase, C18). Die hydrophoben Eigenschaften des Materials sollten durch „endcapping“ mit Trimethylchlorsilan nochmals verstärkt worden sein. Der erzielte C-Gehalt liegt damit $\gg 10$ %.

Zur Einhaltung der Zielsetzung dieses Dokuments, in verschiedenen Laboratorien auf verschiedenen LC-Geräten für dieselbe Probe möglichst übereinstimmende Ergebnisse zu erzielen, sind bezüglich Peakverbreiterung (ausgedrückt durch die Zahl der theoretischen Böden) und Trennleistung die im Folgenden festgelegten Mindestanforderungen einzuhalten; die tatsächlich erreichten Werte sind im Prüfbericht anzugeben.

**Zahl der theoretischen Böden**

Im eingesetzten Gerät muss die theoretische Bodenzahl $N$ je Meter Säulenlänge nach dem Halbe-Höhen-Verfahren bestimmt werden. Unter den auch für die Polymeranalysen benutzten Prüfbedingungen werden max. 20 µl einer Lösung des PEG-1500-Standards (Massenkonzentration min. 1 mg/ml) in die Säulen injiziert und das resultierende Chromatogramm nach Gleichung (1) ausgewertet:

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{w_{0,5}}\right)^2 \frac{100}{L} \quad (1)$$

Dabei ist

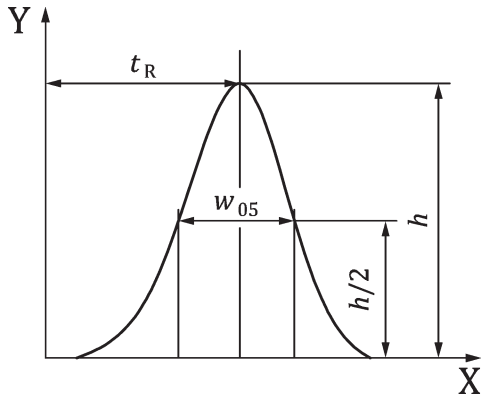
$t_R$ die Retentionszeit am Peakmaximum (es müssen die gleichen Maßeinheiten verwendet werden, z. B. min);

$w_{0,5}$ die Peakbreite bei halber Peakhöhe (siehe Bild 2);

$L$ die Länge der Säule(nkombination), in cm.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04




**Legende**

| | |
|---|---|
| X | Retentionszeit, in Minuten |
| Y | Nachweissignal |
| $t_R$ | Retentionszeit am Peakmaximum, in Minuten |
| $w_{0,5}$ | Peakbreite bei halber Peakhöhe |
| $h$ | maximale Peakhöhe |
| $h/2$ | halbe Peakhöhe |

**Bild 2 — Bestimmung der theoretischen Bodenzahl, Halbe-Höhe-Verfahren**

Das Ergebnis wird als Anzahl der theoretischen Böden je Meter Säulenlänge angegeben. Es sollte eine Säule(nkombination) verwendet werden, die mindestens 5 000 theoretische Böden je eingesetzter Säule(nkombination) erreicht.

### 5.6 Temperiereinrichtungen der Säule

Die Analysen können in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 45 °C durchgeführt werden. Dabei darf sich die Säulentemperatur während einer Analyse nicht um mehr als 0,5 °C ändern. Alle Analysen sind bei derselben Temperatur durchzuführen, denn die LCCC ist ein enthalpischer Prozess und daher temperaturabhängig [1].

### 5.7 Detektoren

Folgende Geräte können als Detektoren eingesetzt werden: Brechungsindexdetektor (RID, en: refractive index detector), Verdampfungslichtstreudetektor (ELSD, en: evaporative light scattering detector) oder Corona CAD (en: Corona charged aerosol detector).

### 5.8 Elutionsmittel

Alle verwendeten Elutionsmittel sollten den Reinheitsgrad „HPLC grade“ besitzen. Die Elutionsmittel sollten nicht in das Vorratsgefäß zurückgeführt werden.

### 5.9 Datenerfassung

Die vom Detektionssystem ausgehenden Signale werden durch ein elektronisches Datensystem erfasst.

## 6 Probenvorbereitung

Die Proben (1 mg/ml bis 2 mg/ml) werden im jeweiligen Elutionsmittel gelöst. Um Veränderungen der Polymere in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit als Fehlerquelle auszuschließen, sollten die Proben innerhalb von 6 h nach Herstellung der Lösung analysiert werden.

Der Validierungs-Kit (Mischung 2) wird mit 2 ml der kritischen Lösemittelzusammensetzung aufgefüllt.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# 7 Durchführung der Messungen

## 7.1 Bestimmung der kritischen Bedingungen

Die Einstellung der kritischen Bedingungen kann entweder durch die Änderung der Temperatur oder durch die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase erfolgen.

Im folgenden Verfahren wird die Temperatur streng konstant gehalten und sukzessive die Lösemittelzusammensetzung bei abnehmendem Acetonitril-Gehalt geändert. Dies kann durch separate Mischung der Komponenten oder mit einer binären Pumpe erfolgen.

Die drei Standards mit unterschiedlicher Molmasse werden in der jeweils gewählten Lösemittelzusammensetzung gemessen. Hierbei ist dringend zu beachten, dass auch das Lösemittel, in dem der Standard gelöst wird, der Elutionsmittelzusammensetzung entspricht.

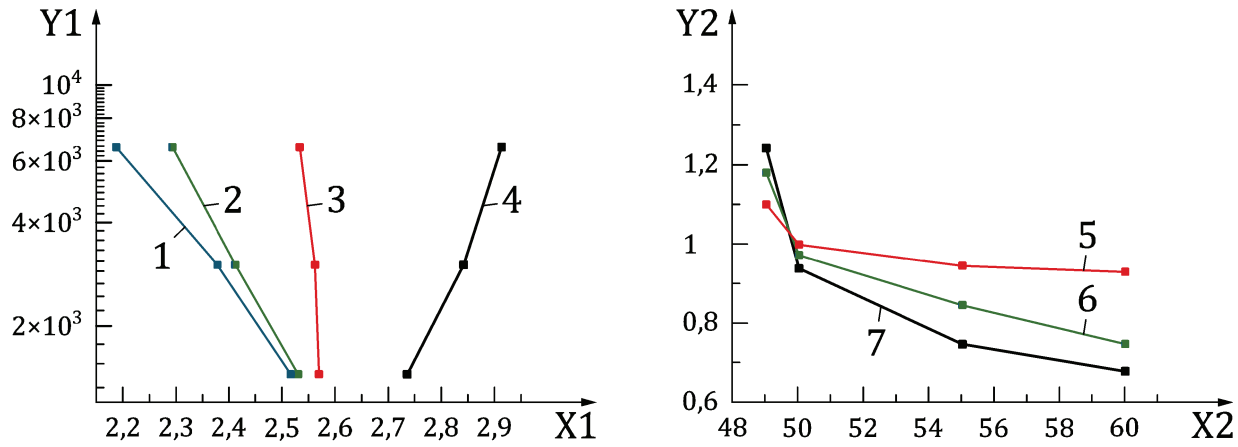
Die kritische Lösemittelzusammensetzung ($ACN : H_2O$) ist erreicht, wenn alle Moleküle der gleichen chemischen Struktur (in diesem Fall PEG-Standards) zur gleichen Retentionszeit eluieren. Das heißt, unter diesen Bedingungen wird das chromatographische Verhalten nicht mehr von der Größe des Moleküls, sondern von chemischer Inhomogenität bestimmt.

Zur Bestimmung der kritischen Lösemittelzusammensetzung wird der Logarithmus der Molmasse $\lg M_p$, in g/mol, gegen die Retentionszeit, in min, (Bild 3, links) bzw. der Retentionsfaktor $k$ gegen den Gehalt der Komponente B im Elutionsmittel, in %, (Bild 3, rechts) aufgetragen.

Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04




**a) Logarithmus der Molmasse gegen die Retentionszeit**

**b) Retentionsfaktor gegen den Gehalt der Komponente B im Elutionsmittel**

**Legende**
X1 Retentionszeit, in Minuten
Y1 lg $M_p$, in Gramm je Mol
X2 ACN, als Volumenanteil in Prozent
Y2 Retentionsfaktor $k$
1 ACN / $H_2O$: 60 % / 40 %
2 ACN / $H_2O$: 55 % / 45 %
3 ACN / $H_2O$: 50 % / 50 %
4 ACN / $H_2O$: 49 % / 51 %
5 PEG 1460
6 PEG 3020
7 PEG 6600

**Bild 3 — Schematische Darstellung der Ermittlung der kritischen Lösemittelzusammensetzung**

Der Retentionsfaktor $k$ errechnet sich nach Gleichung (2):

$$k = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (2)$$

Dabei ist

$t_R$ die Retentionszeit des Standards im jeweiligen System;

$t_0$ die Retentionszeit einer nicht verzögerten Substanz.

## 7.2 Analyse des Validierungs-Kit

Die Probe wird mit 2 ml des kritischen Lösemittelgemisches versetzt und bei Raumtemperatur unter Schütteln gelöst.

Um Veränderungen der Polymere in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit als Fehlerquelle auszuschließen, sollten die Proben innerhalb von 6 h nach Herstellung der Lösung analysiert werden. Auf Temperaturkonstanz der Säule ist zu achten.

Das Injektionsvolumen muss auf den benutzten Säulensatz abgestimmt und kann somit zwischen 5 µl und 25 µl variiert werden.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

Es ist empfehlenswert, vor Messung der Probe einen Blindversuch (Injektion des Elutionsmittels/des reinen Probelösemittels) durchzuführen, um Lösemittelsignale oder Peaks, die durch die Injektion verursacht werden, zu identifizieren.

Die Messung der Probe endet nach vollständiger Elution des letzten Systempeaks und Rückkehr des Signals auf die Basislinie.

Es werden drei Wiederholungsmessungen durchgeführt und die Mittelwerte der Retentionszeit für die getrennten Peaks errechnet.

Die chromatographische Auflösung zweier Peaks $R$ als Qualitätskriterium für die Trennung errechnet sich nach Gleichung (3):

$$R = 1{,}18 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{f,hm,1} + w_{f,hm,2}} \quad (3)$$

Dabei ist

$t_R$ die Retentionszeit;

$w_{f,hm}$ die Halbwertsbreite (en: full width at half maximum).

## 8 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

a) alle Einzelheiten, die zum vollständigen Identifizieren des geprüften Produktes notwendig sind;

b) eine Verweisung auf dieses Dokument (ISO/TS 23973:2020);

c) alle Angaben zum Gerät (Pumpe, Entgaser, Injektionssystem, Säulenofen, Detektoren, Auswertungs-software);

d) alle Angaben zu den Trennsäulen (Hersteller, Trennmaterial- und Porengrößentyp, Korngröße, Anzahl, Abmessungen, C-Gehalt);

e) die Anzahl der theoretischen Böden je Säulenkombination im eingesetzten Flüssigchromatograph;

f) die Säulentemperatur;

g) die Durchflussrate;

h) die kritische Lösemittelzusammensetzung, in Prozent (Massenanteil oder Volumenanteil) mit Angabe der Mischweise (Gradientenpumpe oder separate Herstellung der Mischungen);

i) die Konzentration der injizierten Lösung, in Milligramm je Milliliter (bei selbst einzuwiegenden Proben);

j) das Injektionsvolumen, in Mikroliter;

k) die Überlagerung der Elugramme der drei PEGs mit unterschiedlicher Molmasse;

l) den Flächenprozentreport des Validierungs-Kit, einschließlich Chromatogramm;

m) die Angabe der Mittelwerte der Retentionszeit;

AVA Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

n) die Angabe der chromatographischen Auflösung der Peaks $R_{AB}$, $R_{AC}$ und $R_{BC}$ nach [3].

o) Das Prüfergebnis;

p) jede Abweichung vom festgelegten Prüfverfahren;

q) jede ungewöhnliche Beobachtung (Unregelmäßigkeit) während der Prüfung;

r) das Datum der Prüfung.



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04

# Anhang A
(informativ)

# Fehlerquellen

Die Auswertung der Ringversuche hat gezeigt, dass viele Fehlerquellen nicht nur speziell auf fehlende Erfahrung hinsichtlich der Chromatographie von Polymeren zurückgeführt werden können, sondern diese die Technik der Flüssigchromatographie allgemein betreffen.

Bekanntlich ist die Auflösung $R$ vom Trennfaktor $\alpha$ (Selektivität, Maß für die Trennfähigkeit des chromatographischen Systems), vom Retentionsfaktor $k$ (Kapazität, Maß für die Stärke der Wechselwirkungen) und der Bodenzahl $N$ (Effizienz, Maß für die Bandenverbreiterung der Substanzzone) abhängig.

Entspricht das Ergebnis nicht den Erwartungen, sollten folgende Aspekte überdacht werden:

a) Wurden die optimalen Säulenmaße und das optimale Packungsmaterial gewählt?

   Verbesserung der Auflösung über die Bodenzahl:

   — möglichst lange Säule;

   — möglichst kleine Teilchen;

   — optimale Durchflussraten;

   — Bestimmung des Adsorptionsbereichs und der Ausschlussquote für die gewählte Säule;

   — Bestimmung der Bodenzahl (> 25 000/m);

   — Anpassung der Porengröße an die größte zu untersuchende Molmasse (z. B. > 100 Å bei Molmassen über 6 000 g/mol).

b) Sind durch vorangegangene Injektionen Verschmutzungen/Veränderungen in der Säule aufgetreten, werden die Vorgaben gegebenenfalls nicht mehr eingehalten?

   Dies kann die Selektivität verändern und diese beeinflusst die Auflösung stärker als die Bodenzahl (Trennfaktor $\alpha$).

c) Überlagern Lösemittelsignale und „Systempeaks“ die Peaks des Analyten (besonders bei Verwendung von RI-[und UV-]Detektoren)?

d) Wurden die Spülzeiten beim Umspülen auf neue Lösemittelzusammensetzungen beachtet (Referenzzelle spülen!)?

e) Entsprechen die Kapillarinnendurchmesser und -längen zwischen Säule und Detektor den Anforderungen (maximal 0,12 mm Innendurchmesser)?

f) Gibt es Totvolumen (besonders bei hintereinandergeschalteten Detektoren)?

g) Wurde die Probe tatsächlich im aktuellen Elutionsmittelgemisch analysiert?

AVA Documents
Document Sharing Hub



Full document details: DIN CEN ISO/TS 23973:2022-04